

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATERIAIS

João Ícaro Miranda Morais Garcia

**MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM
TITANATO PARA A ADESÃO DA APATITA**

Botucatu

2024

João Ícaro Miranda Morais Garcia

MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM TITANATO PARA A ADESÃO DA APATITA

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais da UNESP como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margarida Juri Saeki

Botucatu

2024

G216m

Garcia, João Ícaro Miranda Morais

Modificação da superfície de titânio com titanato para a adesão da apatita / João Ícaro Miranda Morais Garcia. -- Bauru, 2024
122 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências, Bauru

Orientadora: Margarida Juri Saeki

1. Titânio. 2. Dip coating. 3. Titanato de cálcio. 4. Sol-gel. 5.
Apatita. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JOÃO ÍCARO MIRANDA MORAIS GARCIA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 10 dias do mês de janeiro do ano de 2024, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JOÃO ÍCARO MIRANDA MORAIS GARCIA, intitulada **Modificação da superfície de titânio com titanato para a adesão da apatita..** A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ROSEMARY APARECIDA DE CARVALHO (Participação Virtual) do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / Universidade de São Paulo, Profa. Dra. ELIANA NAVARRO DOS SANTOS MUCCILLO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciência e Tecnologia de Materiais / Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI

“A persistência é o caminho do êxito”

Charlin Chaplin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades e momentos que vivi ao longo da minha jornada de mestrado. Em especial, a minha família, aos meus pais, meus irmãos e minha avó, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando, me dando força e confiando nas minhas capacidades.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à Professora Margarida Juri Saeki, por sua contribuição essencial na execução desta dissertação. Sem a sua orientação, apoio e conhecimentos, a realização deste sonho não seria possível. Sou grato pela amizade e companheirismo que desenvolvemos ao longo deste processo. Sua presença constante e paciência proporcionaram um ambiente de trabalho colaborativo e motivador, o qual foi fundamental para superar os desafios encontrados ao longo da pesquisa.

Ao coorientador Diego pela valiosa contribuição. Sua vasta experiência e conhecimento foram indispensáveis para o planejamento e execução das atividades de pesquisa.

Ao professor Nilson a contribuição como um dos membros da banca da qualificação e a confiança por ter aberto as portas do Laboratório de plasma da Unesp-Sorocaba, possibilitando a realização e caracterização do revestimento PEO.

Ao professor William Fernando Zambuzzi, pela colaboração em todos os ensaios biológicos, discussão de resultados e especialmente pelo carinho e amizade.

Ao professor Vicente Borraz Amigó sou grato pela incrível oportunidade de estadia em seu laboratório na Universidade Politécnica de Valência, na Espanha. Sua dedicação em fornecer um ambiente de aprendizado foi fundamental para o meu crescimento e desenvolvimento como pesquisador.

A equipe do projeto IBBem do Instituto de Biociências da Unesp-Botucatu, demonstrou um cuidado genuíno ao oferecer psicoterapia e aulas de yoga como parte do projeto foi fundamental para o meu bem-estar emocional e físico ao longo dessa jornada.

Aos amigos do laboratório pelos momentos agradáveis de companheirismo e amizade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

Biomateriais de compósito metal-cerâmica, tem ganhado destaque por oferecer formas de acelerar a regeneração e reabilitação. Neste trabalho estudou-se a modificação de superfície do titânio comercialmente puro (Ti-c.p.) criando-se ou depositando-se filmes de óxido de titânio (TiO_2) contendo titanato de cálcio (CaTiO_3) pelo método sol-gel associado a *dip-coating* ou utilizando-se a técnica de oxidação por plasma eletrolítico (PEO), seguida da deposição de filme de apatita via sol-gel associado a *dip-coating*. As estruturas presentes nos filmes foram caracterizadas por difratometria de raios X (DRX) com refinamento estrutural pelo método de Pawley, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise composicional por energia dispersiva de raios X (EDX), microscopia de força atômica (AFM), perfilometria, molhabilidade, determinação de ponto de carga zero (pH_{PZC}), ensaios mecânicos por flexão de quatro pontos, ensaios de corrosão e biológicos. Os resultados de DRX mostraram que TiO_2 sob estruturas de rutilo e anatase, bem como CaTiO_3 compõe os filmes intermediários. O pH_{PZC} foram de 7,3 e 6,8 para Ti-c.p. contendo camada de óxido de titânio com cálcio preparada pelo método sol-gel e Ti-c.p. com superfície oxidada por plasma eletrolítico (PEO), respectivamente. Diante disso, escolheu-se um método sol-gel cujo sol do precursor de apatita é estável em pH próximo a 6,0, para a sua deposição em filme sobre o Ti-c.p. modificado. Os resultados de DRX mostraram a obtenção de apatitas sob duas estruturas: hidroxiapatita (HAp) e β -fostato tricálcico (β -TCP). A rugosidade, analisada por AFM, diminuiu após a deposição de filmes de apatita sobre Ti-c.p. com e sem modificação. Em contrapartida, houve um aumento da molhabilidade (superfície mais hidrofílica). As espessuras dos filmes de apatita sobre Ti-c.p. foram de 1,5 μm , mas quando depositado sobre um filme intermediário de CaTiO_3 obtido via sol-gel ou modificado por PEO foram respectivamente de 0,6 μm e 2,5 μm , promovendo um aumento da força de adesão do filme de apatita no substrato de titânio. Ambos os revestimentos diminuíram a taxa de corrosão. Os valores de tensão de flexão para um deslocamento de 1mm e módulo elasticidade não mudaram significativamente com as modificações feitas. O ensaio de toxicidade por contato direto demonstrou menor viabilidade de pré osteoblastos nas superfícies modificadas via PEO, apatita e CaTiO_3 com apatita. Por outro lado, a deposição de filmes de apatita sobre Ti-c.p. modificado via PEO aumentou expressivamente a viabilidade quando comparadas com a do controle. Na viabilidade estudada por contato indireto, as modificações não apresentaram diferenças em relação ao controle. A adesão de pré osteoblastos por contato direto foi maior em todas as amostras quando comparadas com a do controle. Em contrapartida,

por contato indireto, não apresentou diferença significativa em comparação com o controle. Na análise de expressão gênica, o RTqPCR (Reação em Cadeia da Polimerase, quantitativa e em tempo real) demonstrou que as diferentes modificações de superfícies influenciaram a capacidade de modular a expressão de genes envolvidos na diferenciação osteoblástica e na síntese de matriz extracelular, expresso pelas diferenças encontradas nas metaloproteinases, assim como pelo estímulo angiogênico representado pela expressão de *Vegf* (fator de crescimento endotelial vascular).

Palavra-chave

titânio; *dip coating*; sol-gel; titanato de cálcio; oxidação eletrolítica assistida por plasma (PEO); apatita; pré-osteoblastos.

ABSTRACT

Biomaterials based on metal-ceramic composite have received attention because they accelerate the regeneration and rehabilitation between the implant and bone. In this work, the surface of commercially pure titanium (c.p.-Ti) was modified by creating or depositing films of titanium oxide (TiO_2) containing calcium titanate (CaTiO_3) using sol-gel method associated with dip-coating technique or by the electrolytic plasma oxidation (PEO), followed by deposition of apatite layer via sol-gel/dip-coating. The films were characterized by X-ray diffractometry (XRD) with structural refinement by Pawley's method, scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), atomic force microscopy (AFM), profilometry, wettability study, determination of zero charge point (pH_{PZC}), four point bending tests (mechanical property), corrosion behavior study and biological assays. The XRD results showed that TiO_2 under rutile and anatase structures as well as CaTiO_3 formed in the sol-gel films. The pH_{PZCS} were 7.3 and 6.8 for c.p.-Ti with calcium containing titanium oxide layer prepared by sol-gel method and c.p.-Ti oxidized by electrolytic plasma (PEO), respectively. Based on this results, a sol-gel method whose apatite precursor sol is stable at $\text{pH}=6.0$ was chosen for depositing it on the modified c.p.-Ti. The XRD results showed that apatites formed on c.p.-Ti are composed by hydroxyapatite (HAp) and β -tricalcium phosphate (β -TCP). The AFM analysis showed that the roughness decreased after the deposition of apatite layer on c.p.-Ti, independently of the modification. In contrast, the wettability increased becoming the surface more hydrophilic. The thicknesses of apatite films on c.p.-Ti were $1.5 \mu\text{m}$, but when deposited on a CaTiO_3 containing layer prepared via sol-gel and modified by PEO were $0.6 \mu\text{m}$ and $2.5 \mu\text{m}$, respectively. Both coatings contributed to increase the corrosion resistance. Flexural stress required for a 1mm displacement and elasticity modulus did not change significantly with modifications. The direct contact toxicity test showed lower viability of pre-osteoblasts on surfaces modified via PEO, apatite and CaTiO_3 with apatite. On the other hand, the deposition of apatite films on PEO-modified Ti-c.p. significantly increased viability when compared to the control. Regarding the viability studied by indirect contact, the modifications showed no differences in relation to the control. The adhesion of preosteoblasts by direct contact was higher in all samples when compared to that of the control. On the other hand, indirect contact showed no significant difference compared to the control. The gene expression analysis by RTqPCR (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction) showed that the different surface modifications

influenced the ability to modulate the expression of genes involved in osteoblast differentiation and extracellular matrix synthesis, expressed by the differences found in metalloproteinases, as well as angiogenic stimulation represented by *Vegf* expression (Vascular Endothelial Growth Factor).

Keyword

Titanium; Dip coating; Sol-gel; Calcium titanate; Plasma assisted Electrolytic Oxidation (PEO); apatite; Pre-osteoblasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Montagem utilizada para a oxidação eletrolítica assistida por plasma: (a) sistema completo com fonte de tensão à esquerda e reator, e (b) foto ampliada do reator.	23
Figura 2. Agitador rotativo tipo Wagner.	26
Figura 3. (a) Equipamento, Struers, CitoPress-1. (b) Amostra embutida na resina.	28
Figura 4. Montagem da célula eletroquímica utilizada nos ensaios de corrosão.	32
Figura 5. (a) Montagem esquemática do dispositivo para ensaio de flexão de quatro pontos; (b) Ilustração para a identificação do mapa de calibração do dispositivo.....	34
Figura 6. Imagem do ensaio de flexão de quatro pontos no software Trapezium X.	35
Figura 7. Placa especial de 96 poços para PCR e esquema da montagem experimental para a análise de expressão gênica (RT-qPCR).	44
Figura 8. Ciclos de temperaturas, e respectivos tempos, aos quais os cDNAs foram submetidas para a análise por RT-qPCR.	46
Figura 9. Esquema dos processos que ocorrem num ciclo de uma análise de expressão gênica por RT-q-PCR.	46
Figura 10. Determinação do pH no ponto de carga zero (PZC) pelo método de deslocamento de pH em 24h, das amostras de: (a) Ti-c.p. modificado por deposição de titânia contendo cálcio e (b) Ti-c.p. modificado por PEO.....	53
Figura 11. Padrão de difração de raio X (DRX) do pó de apatita, preparada por processo sol-gel, à partir de nitrato de cálcio e pentóxido de fósforo em etanol à 0,7mol/L, gelatinização à 25 °C, secagem à 80 °C e tratamento térmico entre 500 °C e 700° C por 8 h ao ar.	54
Figura 12. Padrão de difração de raios X (DRX) das amostras: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita. Medidas feitas sob modo 2theta/theta.....	59
Figura 13. Imagens obtidas por MEV-EC das superfícies das amostras de Ti-c.p. sem e com modificações: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO com apatita. Detector de elétrons secundários, com magnificação 1000x.....	60

Figura 14. Análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p.: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.....	62
Figura 15. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti- c.p com camada de titanato contendo cálcio: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.	63
Figura 16. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p. modificada por PEO: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.	64
Figura 17. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p com apatita: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.	65
Figura 18. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p. com titanato de cálcio (via sol-gel) e apatita: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.	66
Figura 19. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p. modificada por PEO e recoberta por apatita (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.	66
Figura 20. Imagens de MEV-EC da seção transversal de Ti-c.p. com filmes modificadores: (a) Ti-c.p. com apatita; (b) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (c) Ti-c.p. com modificação superficial por PEO e apatita. Detector utilizado foi de elétrons secundários com magnificação 5000x (a e b) e 15000x (c).....	67
Figura 21. Estudo da influência das modificações na rugosidade das amostras de Ti-c.p. sem e com modificações: (a) Perfis de rugosidade; (b) quantificação de rugosidade quanto à Ra (barra cheia) e Rq (barra quadriculada). Amostras: (1) Ti-c.p. (preto); (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio (vermelho); (3) Ti-c.p. modificado por PEO (verde); (4) Ti-c.p. com apatita (azul); (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita (azul claro) e (6) Ti-c.p. modificado por PEO com apatita (rosa).....	68

Figura 22. Imagens topográficas em 3D, obtidas por Microscopia de Força Atômica (AFM), de: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.	70
Figura 23. Quantificação de rugosidade quanto à Ra (barra cheia) e Rq (barra quadriculada) por Microscopia de Força Atômica (AFM) das amostras: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.	70
Figura 24. Ângulo de contato das gotas de água sobre superfície das amostras de: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO com apatita.	72
Figura 25. Potencial de circuito aberto, versus eletrodo de referência de Ag/AgCl, em 3600 s em solução de Ringer-Hartmann à 37°C sobre superfície das amostras de: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.	74
Figura 26. Curva de polarização em solução Ringer Hartmann, à 37 °C. Amostras: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.	75
Figura 27. Gráfico de Tensão versus Deformação, relativo ao ensaio de flexão em 4 pontos. Amostras (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.	77
Figura 28. Imagens obtida por microscópio óptico das superfícies das amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, após o ensaio de flexão: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita. Resolução 280x1024 px e lente 20x 0,45 10BD..	79
Figura 29. Foto das amostras (2,5x3cm) de Ti-c.p. sem e com modificações: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita e dollies a esquerda e a direita fotomicrografia demonstrando a delimitação das regiões testada e não testada após teste de adesão. Magnificação de 1600 vezes.....	82
Figura 30. Ensaio de viabilidade celular de MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) contato direto e (b) contato indireto. Ambos os gráficos apresentam os	

grupos: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. . modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de de três experimentos independentes realizados em sextuplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p=0,0001$ e **** $p < 0,0001$ 84

Figura 31. Ensaio de adesão celular de MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) contato direto e (b) contato indireto. Ambos os gráficos apresentam os grupos: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em sextuplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p=0,0001$ e **** $p < 0,0001$ 85

Figura 32. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de células MC3T3-E1 cultivados em contato direto por 7 dias com as seguintes superfícies: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita. Detector de elétrons secundários, com magnificação 1000x..... 86

Figura 33. Expressão de genes envolvidos no processo de adesão celular de células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) Integrina- $\alpha 1$; (b) Integrina- $\beta 1$; (c) Fak; (d) Cofilina; (e) Col3a1. Todos os gráficos apresentam os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata em comparação com Ctrl. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ 89

Figura 34. Expressão de genes marcadores ósseos de células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) Bsp; (b) Runx-2; (c) Otc. Todos os gráficos apresentam os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata em comparação com Ctrl. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ 91

Figura 35. Expressão do gene Vegf em células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações. Todos os gráficos apresentam os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata em comparação com Ctrl. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ 92

Figura 36. Expressão de genes de remodelamento de matriz extracelular e zimografia de células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) Timp 1; (b) Timp 2; (c) Mmp2; (d) Mmp9; (e) Zimografia de Mmp2; (f) Zimografia de Mmp9; (g) Gel de Zimografia. Todos os gráficos apresentam os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata em comparação com Ctrl. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ 94

Figura 37. Ensaio de ALP em células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações. A figura apresenta os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. 95

Figura 38. Ensaio de vermelho de alizarina em células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, sendo (a) imagem das células e (b) identificação da cor vermelha pelo ImageJ. A figura apresenta os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. 96

Figura 39. Gráfico da quantificação da coloração vermelho de alizarina das imagens óticas pelo ImageJ. A figura apresenta os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. 96

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Componentes da tensão de superfície dos líquidos indicadas pelo software ADVANCE.....	31
Tabela 2. Composição da solução Ringer-Hartman.	32
Tabela 3. Sequência do pares de primers e detalhes técnicos para ensaios de RT-qPCR em função dos genes.....	45
Tabela 4. Resultados obtidos por refinamento estrutural (Método de Pawley) dos padrões de difração das amostras de apatitas preparadas com o precursor à 0,7 mol/L e tratadas a 500 °C, 600 °C e 700 °C por 8 h.....	54
Tabela 5. Ângulo de contato da água e diiodometano com as amostras de Ti-c.p. com e sem modificações de superfícies.....	72
Tabela 6. Componentes dispersivos e polares da tensão superficial e energia de superfície dos sólidos calculados.	73
Tabela 7. Parâmetros cinéticos obtidos das curvas de polarização, obtidos em solução Ringer Hartmann, a 37° C, para as amostras de Ti-c.p. com diferentes modificações de superfícies..	76
Tabela 8. Força de adesão (normalizada por área) dos revestimentos nos substratos metálicos de Ti c.p.	80
Tabela 9. Componentes da tensão de superfície dos líquidos indicadas pelo software ADVANCE.....	118

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

λ - comprimento de onda

Å - angstrom

a - massa atômica

AFM - microscópio de força atômica

Alp - fosfatase alcalina

APS - persulfato de amônio

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

ATCC - *American Type Culture Collection*

b_a - inclinações de Tafel do processo anódico

b_c - inclinações de Tafel do processo catódico

BCP - cerâmica bifásica de fosfato de cálcio

BSE - elétrons retroespalhados

Bsp - sialoproteína óssea

C - ciclo

CDHA - hidroxiapatita deficiente em cálcio

Col3 α - colágeno tipo III

C_r - taxa de corrosão

C_t - *cycle threshold*;

D - densidade

D - deslocamento para a deformação da amostra

DNA - ácido desoxiribonucleico genômico

DRX - difração de Raios X

DTA - análise térmica diferencial

E - potencial

EC-EDX - detector de Energia Dispersiva de Raios X acoplado a um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo

E_{corr} - potencial de corrosão

F - força

Fak - Quinase de Adesão Focal

FBS - soro fetal bovino

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h - espessura do corpo de prova
HAp - hidroxiapatita
HGNC - Comitê da Nomenclatura de Gene
HUGO - Organização do Genoma Humano
i - densidade de corrente
ICDD - *International Center for Diffraction Data*
 i_{corr} - densidade de corrente de corrosão
 K_{β} - decaimento do elétron da camada M para camada K
 K_{α} - decaimento do elétron da camada L para camada K
L - distância entre os apoios inferiores
LM - linha média
MEV-EC - microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo
Mmp-2 - metaloproteinases de matriz tipo 2
Mmp-9 - metaloproteinases de matriz tipo 9
MO – indutores osteogênicos
mRNAs - ácidos ribonucléicos mensageiros
n - número de elétrons envolvidos na mudança na valência
NBR - norma brasileira
OCP - potencial de circuito aberto
Otc - Osteocalcina
PAD - fosfato ácido dissódico
PBS - tampão fosfato
PCZ - ponto de carga zero
PDF - *Powder Diffraction File*
PEO - oxidação eletrolítica assistida por plasma
 Q_0 - quantidade inicial desse cDNA
 Q_{Ct} - quantidade total de cDNAs
Ra - rugosidade média aritmética
RFU- unidade relativa de fluorescência
 RFU_{Ct} - intensidade limiar de detecção
RMS - *Root Mean Square*
RNA - ácidos ribonucléicos

R_p - resistência de polarização

R_q - rugosidade média quadrática

RT-qPCR - *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*

RunX2 - fator de transcrição 2 relacionado a runt

SDS - dodecil sulfato sódico

SE - elétrons secundários

TG - análise termogravimétrica

Ti-c.p - titânio comercialmente puro

Timp 1 - membro da família dos inibidores teciduais das Mmps 1

Timp 2 - membro da família dos inibidores teciduais das Mmps 2

TRIS - tampão de tris(hidroximetil)aminometano

UPV - Universidade Politécnica de Valencia

Vegf - fator de crescimento endotelial vascular

β -TCP - β -Fosfato Tricálcico

ϵ - deformação

σ - tensão

γ_L - tensão superficial do líquido

γ_L^D - tensão superficial dispersiva do líquido

γ_L^P - tensão superficial polar do líquido

γ_S - tensão dispersiva do sólido

γ_S - tensão polar do sólido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	21
3.1.1	Tratamento Mecânico	21
3.1.2	Tratamento Químico	21
3.1.3	Preparação da camada intermediária.....	21
3.1.4	Preparação do sol de óxido de titânio contendo titanato de cálcio e deposição na forma de filme (Sol-gel/imersão).....	21
3.1.5	Oxidação eletrolítica assistida por plasma (PEO)	22
3.1.6	Preparação do sol de apatita e deposição na forma de filme.....	23
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	24
3.2.1	Determinação do Ponto de Carga Zero (PZC ou pH_{PZC})	24
3.2.2	Difratometria de Raios X	26
3.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
3.2.4	Quantificação da espessura do filme	27
3.2.5	Perfilometria de contato	28
3.2.6	Microscopia de Força Atômica	29
3.2.7	Molhabilidade, ângulo de contato e energia de superfície	30
3.2.8	Ensaio de corrosão	32
3.2.9	Ensaio Mecânico.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Determinação do ponto de carga zero	52
4.2	Otimização das condições para a preparação de apatita	53
4.3	Difratometria de raios X (DRX) dos filmes modificadores de Ti-c.p.	58
4.4	Análise morfológica e composicional das superfícies modificadas de Ti-c.p. por MEV-EC e EC-EDX60	
4.5	Determinação da espessura dos filmes modificadores	67
4.6	Perfilometria de contato	68
4.7	Microscopia de Força Atômica (AFM).....	69
4.8	Molhabilidade (ângulo de contato) e energia de superfície	71
4.9	Ensaio de corrosão	74
4.10	Ensaio Flexão de quatro pontos.....	77

4.11	Força de Adesão	79
4.12	Ensaio Biológico.....	83
5	CONCLUSÃO	97
6	REFERÊNCIA	99
7	APÊNDICE	112
A1.	Difratometria de Raios X.....	112
A2.	Refinamento de Pawley	112
A3.	Microscopia Eletrônica de Varredura	114
A4.	Perfilometria de contato.....	115
A5.	Microscopia de Força Atômica.....	117
A6.	Molhabilidade, ângulo de contato e energia de superfície	118
A7.	Ensaio de corrosão	119
A8.	Ensaio Mecânico	121

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento na demanda pelos implantes biomédicos de longa duração (HEIMANN, 2013), estudos técnico-científicos alertam para a importância do aprimoramento dos materiais já disponíveis para melhorar a qualidade de vida dos pacientes a um custo e tempo aceitável (CHOI; KARACAN; BEN-NISSAN, 2020). Geralmente, os insucessos dos implantes são associados a sua fixação biológica não adequada ao osso (OSHIDA et al., 2010). É também de vital importância para qualquer sistema de implante que não promova respostas inflamatórias (PONGNARISORN et al., 2007).

O interesse em melhorar implantes metálicos como titânio comercialmente puro (Ti-c.p.) e suas ligas tem crescido (ELIAS et al., 2015; MOREJÓN-ALONSO et al., 2022). Embora estes materiais apresentem boas propriedades mecânicas, químicas (boa resistência à corrosão em ambientes biológicos) e de biocompatibilidade (SCHENK; BUSER, 1998), requerem revisão cirúrgica, devido ao longo tempo requerido para a cicatrização óssea e à baixa longevidade dos materiais (CECCHINATO et al., 2012).

Novos processos industriais podem interferir na microestrutura e na morfologia do material base (LIU; CHU; DING, 2004). Processamentos térmicos e/ou mecânicos, geram formação de diferentes fases, que afetam a dureza, resistência mecânica (ZHU, KIM, JEONG, 2001) e química (LETIĆ-GAVRILOVIĆ, SCANDURRA, ABE, 2000).

A fabricação de ligas metálicas à base de titânio e/ou modificação química da superfície (CHOI; KARACAN; BEN-NISSAN, 2020), para criar interfaces à base de materiais ósseo-integráveis, promovem melhor ancoragem do implante ao osso e podem garantir excelentes propriedades mecânicas, físicas e biológicas (BENENTI; CASATI; STRINI, 2004). Nenhum metal é considerado inteiramente inerte, sendo passível à oxidação (OLIVEIRA et al., 2015a), causando efeitos adversos, devido à degradação do material e liberação de íons metálicos nocivos ao organismo (ELIAZ, 2019).

A modificação superficial com materiais bioativos pode auxiliar na integração com o osso, além de servir de barreira para a difusão de íons (ROESSLER et al., 2001). Dentre os materiais bioativos, a cerâmica sintética à base de fosfato de cálcio (apatitas) apresenta propriedades de osteocondutibilidade e osteoindutibilidade intrínseca, fundamental para um material biocompatível (FARZADI et al., 2011). Apesar das semelhanças químicas com o osso, a deposição de hidroxiapatita tem apresentado falhas (PYLYPCHUK et al., 2016), evidenciadas pela baixa adesão na superfície do titânio, material mais utilizado em implantes. Apresenta

menor resistência mecânica comparada à do tecido ósseo e baixa tenacidade à ruptura (SALVADOR et al., 2018). Em contrapartida, favorece a proliferação celular, sendo considerado um material promissor (DEHGHANI FIROOZABADI; RAMAZANI SAADATABADI; ASEFNEJAD, 2024).

Uma alternativa promissora para minimizar a baixa adesão direta da apatita é a busca de novas técnicas de funcionalização de superfícies, na interface titânio/apatita (ARDHY et al., 2023). No entanto, há aqueles que demonstram incertezas sobre a existência de camadas intermediárias bioativas (FAIS et al., 2021). A modificação química da superfície pode interferir na ligação intermateriais, fortalecer reatividade do fosfato de cálcio e melhorar a adsorção por meio de força atrativa, devido à interação entre o modificador e superfície (HACIOGLU et al., 2020).

Pesquisadores buscam alternativas que visam a minimizar os riscos e as possíveis carências de propriedades acima mencionadas frente ao uso direto de apatitas sobre o titânio (HSU et al., 2023). Há evidências de que a formação de camada de óxido, sobre o titânio antes da deposição de hidroxiapatita (HAp), aumenta a força de união entre as camadas (ARDHY ARDHY et al., 2023) e diminui a progressão da dissolução da camada de HAp em ambiente ácido, proporcionada durante a reabsorção osteoclástica no corpo (GONÇALVES, 2021).

Alguns autores demonstram efeitos benéficos na implantação iônica de cálcio durante o tratamento de oxidação do titânio. Esse modificador age como ativador da osteogênese e leva ao crescimento celular (INOUE et al., 2010). Com a adição do cálcio, há indícios de formação da fase de titanato de cálcio (CaTiO_3) que, além de aumentar a estabilidade química, evita a dissolução do revestimento (PIRES, 2023). Leva também à maior adesão entre o titânio e HAp (CHEN et al., 2023).

As formas convencionais de síntese para depositar CaTiO_3 na superfície, tais como coprecipitação (ZHANG et al., 2008), tratamento hidrotérmico (ZHANG et al., 2009), solução orgânico-inorgânica (EVANS et al., 2003), combustão (FALSETTI; MELO, 2019) e sol-gel (RAKNGARM; MIYASHITA; MUTOH, 2008a), são métodos químicos já estudados, que proporcionam pouca força de adesão ao metal, levando à esfoliação e à ruptura da camada. Isso faz com que, na maioria das vezes, a modificação se torne inviável.

Em contrapartida, outros pesquisadores qualificam os processos acima como promissores, de fácil comercialização e de baixo custo (SULTANA; YANG; HU, 2012). Isso se deve ao fato dos precursores serem líquidos e organo solúveis, possibilitando preparar sóis com diferentes viscosidades e que facilitam o controle da espessura dos filmes depositados sobre as superfícies. Fu e colaboradores (2011) não descartaram a síntese por método sol-gel:

a fraca adesão do filme foi por eles fortalecida através de banho químico em soluções de NaOH e HCl (FU et al., 2011). Rakngarm (2008) e colaboradores observaram que liga Ti6Al4V tratada quimicamente com NaOH a 5 mol/L antes da deposição de HAp pelo método biomimético apresentou boa adesão para HAp e atribuíram o fato para a interação entre Na₂TiO₃ com TiO₂ (RAKNGARM; MIYASHITA; MUTOH, 2008b).

Esses esforços fazem com que o processo sol-gel seja considerado como alternativa. Nesse processo, as partículas coloidais de sol condensam-se como um gel sob uma estrutura desordenada que, ao serem submetidas ao tratamento térmico, transformam-se em filmes com estrutura cristalina, definida e homogênea (LIU et al., 2002), importantes no controle das propriedades estruturais, texturais e morfológicas da superfície (BALAMURUGAN et al., 2009a).

Todavia, processos de revestimentos físicos, como *sputtering* por *RF-Magnetron* (OHTSU et al., 2007a), deposição assistida por feixe de íons (OHTSU et al., 2008) e deposição por laser pulsado (OHTSU et al., 2007b), apesar de apresentarem vantagens na preparação de filmes homogêneos com espessura controlada, necessitam maquinários sofisticados e complexos, equipados ainda a sistema de ultra-alto vácuo, com altos investimentos.

Esforços para elaborar novas formas de processamento, a custo aceitável, para a adesão das camadas bioativas com estabilidade estrutural e uso clínico em longo prazo são ainda empregados (AKIN et al., 2001) pois, embora os revestimentos já citados forneçam camadas bem sucedidas quanto à composição, geometria dos implantes e morfologia da superfície com boa resistência adesiva, ainda não estão exploradas suficientemente (HAN et al., 2008).

Nas últimas décadas, o método de oxidação eletrolítica por plasma (PEO) que proporciona superfícies de grande dureza (KOSTELAC et al., 2023) e resistência mecânica (ERFANIFAR et al., 2017), com porosidade, tem se destacado. É um método empregado em uma variedade de metais como, titânio, alumínio, magnésio, nióbio, ligas, tântalo e aço (JÚNIOR, 2014). A formação do filme de óxido ocorre durante as descargas elétricas e geração de plasma associados à polarização anódica sob alta voltagem e corrente em contato com uma solução eletrolítica (WHEELER et al., 2010). Ligada à superfície do material, cresce uma camada de óxido, que em altas voltagens experimenta descargas de plasma ou micro-arcos de alta potência e temperatura acompanhada por uma emissão acústica de baixa frequência (CURRAN; CLYNE, 2006). Isso causa a oxidação do metal e sua fusão localizada, que solidifica rapidamente, ocasionando a formação de uma camada rígida, espessa, com poros em formato de vulcões, permitindo também a incorporação das substâncias originadas do eletrólito (OLIVEIRA et al., 2015b).

Essa técnica de oxidação eletrolítica já foi estudada por Ishizawa e Ogino (1995) que demonstraram sucesso na obtenção de um filme de óxido de titânio anódico, contendo espécies bioativas de Ca e P incorporadas na camada de óxido. Apesar da baixa incorporação das espécies, após imersão em um fluido corpóreo simulado, o filme de apatita formado apresentou alta resistência adesiva na superfície (ISHIZAWA; OGINO, 1995). Anos depois, os trabalhos de Hang (2003) e Song (2004) relataram excelente incorporação de Ca e P a partir das substâncias contidas no eletrólito, ajustando a corrente aplicada, tempo de tratamento, ciclo de trabalho, frequência, densidade de corrente e polarização. Estas variáveis também afetam diretamente as estruturas da camada de óxido formadas (HAN; HONG; XU, 2003) (SONG et al., 2004c).

Sendo assim, neste trabalho propõe-se modificar a superfície do titânio pela deposição de filmes intermediários ricos em CaTiO_3 , por duas vias distintas: sol-gel e PEO, e posteriormente recobrir com apatita, via sol-gel. Propõe-se também estudar a morfologia e a estrutura da superfície modificada, as propriedades eletroquímicas (susceptibilidade à corrosão), bem como as características mecânicas. Por fim, as características morfológicas das células após a interação com os materiais são estudadas. Essas são metas para trazer melhores benefícios aos materiais para implante à base de titânio.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo modificar a superfície do material usado em implantes: Ti-c.p. (titânio comercialmente puro), pela deposição de filmes finos intermediários ricos em CaTiO_3 por processo sol-gel/imersão e por oxidação eletrolítica assistida por plasma (PEO), seguido da deposição de apatita via método sol-gel/imersão, para melhorar a integração com o osso.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O material metálico utilizado como substrato foi o Titânio comercialmente puro (Ti c.p.), de grau 2, designado como ASTM F67 GR2 (*American Society for Testing and Materials*, com teor em oxigênio < 0,25%) próprio para aplicações médicas. Foi fornecido pela REALUM (SP) laminado nas espessuras de 0,5 mm ou 1 mm.

3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.1 Tratamento Mecânico

Antes de serem modificadas, as placas de titânio (Ti-c.p.) foram submetidas ao polimento mecânico usando lixa d'água com seguintes granulações: 210 mesh, 400 mesh e 1200 mesh, a fim de eliminar imperfeições, impurezas e camadas de óxido. Esse polimento foi feito na presença de água para evitar aquecimento excessivo. Após este processo, as amostras foram lavadas com detergente e água e em seguida enxaguadas e lavadas usando água ultrapurificada (18,2 MΩ cm) com auxílio de um banho ultrassônico (Unique, USC-1800 de 40 kHz) durante 10 minutos. Logo, foram secadas em temperatura ambiente e, posteriormente, submetidas a tratamentos químicos.

3.1.2 Tratamento Químico

Após o polimento, as amostras foram mergulhadas em HCl a 10% (Nuclear, 36,5% - 38,0%) durante 1 hora a 25 ± 2 °C e enxaguadas três vezes em água ultrapurificada (18,2 MΩ cm), com auxílio de um banho ultrassônico por 10 minutos e secas.

3.1.3 Preparação da camada intermediária

A camada intermediária de óxido de titânio contendo titanato de cálcio foi preparada por dois métodos diferentes: sol-gel/imersão adaptado (MARTIM, 2013) e oxidação eletrolítica assistida por plasma (PEO) (SONG et al., 2004b).

3.1.4 Preparação do sol de óxido de titânio contendo titanato de cálcio e deposição na forma de filme (Sol-gel/imersão)

As placas de titânio foram recobertas por imersão/emersão (*dip coating*) em um sol precursor de óxido de titânio e titanato de cálcio, seguido de tratamento térmico. O sol precursor foi preparado da seguinte maneira. Em um béquer contendo ácido glacial (J.T.Baker, 99,8%) em quantidade suficiente para (q.s.p.) $\text{Ti}/\text{H}^+=1:5$ adicionou-se lentamente o isopropóxido de titânio $\text{Ti}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_4$ (Aldrich, P.A. 97%). A adição do ácido acético glacial foi para reduzir a taxa de hidrólise pela complexação do íon titânio. A solução foi diluída com isopropanol (Merck, P.A. 99,8%) e mantida sob agitação magnética durante uma hora, sempre fechada (com filme de PVC), constituindo-se a solução A. Separadamente, dissolveu-se nitrato de cálcio tetraidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, 99% em q.s.p. $\text{Ti}/\text{Ca}= 2:1$ em uma solução diluída de ácido nítrico (Baker, 69%), denominada de solução B. Essa solução foi então adicionada à solução A

e mantida sob agitação magnética por mais 1 h obtendo-se assim o sol precursor de óxido de titânio com titanato de cálcio. O controle da espessura do filme foi feito pela velocidade de retirada das placas de titânio, que foi de 5,0 cm/min, após sua imersão, por um equipamento elaborado no laboratório (*dip-coater*). Em seguida, os filmes foram hidrolisados em temperatura e umidade ambiente por 30 minutos e pré-calcinados a 250 °C em um forno tipo mufla (EDG, modelo 3P-S) por 15 minutos ao ar. Posteriormente, eles foram calcinados a 400°C por 8 horas no mesmo forno, obtendo-se um xerogel. Estas temperaturas foram estabelecidas com base nos resultados da análise termogravimétrica associada à análise térmica diferencial (TG/DTA) do pó precursor e difratometria de raios X de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (MARTIM, et. al. 2013)

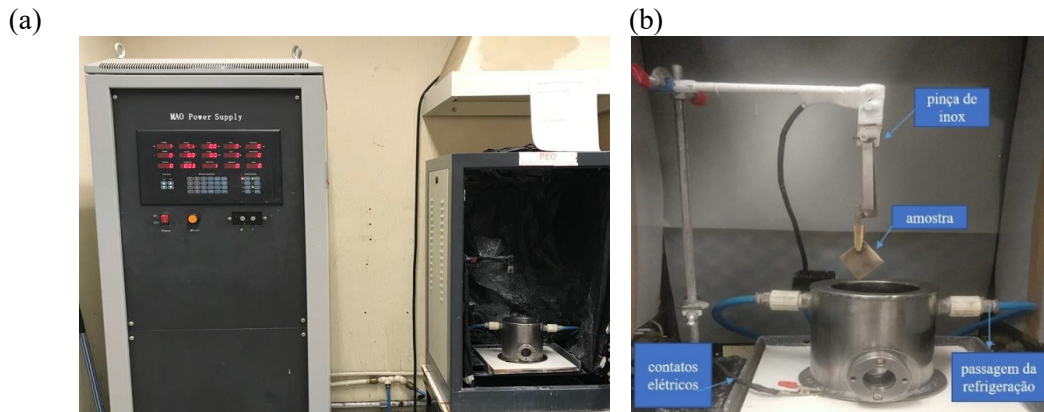
3.1.5 Oxidação eletrolítica assistida por plasma (PEO)

Trata-se de um processo de eletrólise, sendo que a principal diferença com o convencional é que na PEO usa-se tensões mais altas e, por sua vez, um campo elétrico mais alto. Inicialmente, a camada externa do metal (eletrodo de trabalho ou ânodo) é oxidado e há um aumento da espessura desse óxido, que é isolante. Contudo, o campo elétrico é intenso o suficiente para promover a ruptura dielétrica e aparecimento de microdescargas que, associadas à diferença elevada de potencial, formam micro-arcos. A temperatura nos canais de descarga chega a 10³ K e uma combinação de átomos de metal e oxigênio ou íons ocorre dentro desses canais. O oxigênio e outros gases como H₂ formam na eletrólise, bem como o solvente evapora, formando um envelope de plasma pela ionização do vapor gasoso com a descarga, que podem ser visualizados como faíscas e bolhas gasosas. O PEO associa a eletrólise (via plasma) aos processos térmicos e promove difusão, novas reações e ainda o transporte de partículas, produzindo camadas de óxido mais espessas de alta cristalinidade, maior dureza, mais estáveis quimicamente e resistentes ao desgaste, calor e corrosão.

A criação da camada por PEO na superfície do Ti-c.p. foi realizado em um reator de aço inoxidável de parede dupla para a refrigeração do sistema com a circulação de água (Figura 1) que mantinha o eletrólito aquoso, constituído de β-glicerofosfato dissódico pentahidratado, C₃H₇Na₂O₆P·5H₂O (Dinâmica Ltda, 68,0 – 74,0 %) e acetato de cálcio monohidratado, Ca(CH₃CO₂)₂.H₂O (Dinâmica Ltda, 99%), ambos à 0,4 mol/L, a temperatura abaixo de 80°C. As placas de Ti-c.p. foram posicionadas no centro do reator contendo a solução eletrolítica. Um potencial positivo (ânodo) foi aplicado nas placas de titânio, cujo contato elétrico era uma pinça em aço inoxidável, enquanto o reator de aço inox serviu de cátodo, ligado diretamente na fonte de tensão. As amostras de titânio foram anodizadas sob tensão pulsada de 450 V, frequências

de 1000 Hz, com o ciclo de trabalho de 60%, durante 3 min (SONG et al., 2004a). Após a anodização, as amostras foram enxaguadas com água destilada e secas imediatamente com auxílio de um secador (Bosch GY-HY-48300-1) na temperatura de 350-550°C.

Figura 1. Montagem utilizada para a oxidação eletrolítica assistida por plasma: (a) sistema completo com fonte de tensão à esquerda e reator, e (b) foto ampliada do reator.



Fonte autor (2022).

3.1.6 Preparação do sol de apatita e deposição na forma de filme

A deposição da apatita na forma de filme sobre o Ti c.p., com e sem a superfície modificada por deposição de óxido de titânio contendo titanato de cálcio (sol-gel ou PEO), foi feita usando o método sol-gel associado à técnica de *dip-coating*. Para o preparo do sol precursor de apatita dissolveu-se inicialmente nitrato de cálcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Dinâmica, 99%) em etanol (Merck, 99%). Separadamente, o pentóxido de fósforo, P_2O_5 (Synth, 85% P.A.), foi adicionado ao etanol para promover reações de desidratação e formação de etil fosfitos (mistura de mono, di e trietil fosfitos). A solução precursora de cálcio foi então adicionada gota a gota à solução precursora de fósforo utilizando para isso um tempo total de 30 min. Em seguida, o “pH” da solução foi ajustado para 6, utilizando hidróxido de amônia, NH_4OH (Honeywell Fluka, 28-30% P.A.) diluído em etanol (NIU et al., 2015). As quantidades de reagentes e solventes foram tal que a concentração de apatita na solução final fosse de 0,7 mol/L. Finalmente, a solução foi envelhecida (hidrolisada por condensação parcial) por 4 h à temperatura ambiente para obter um sol transparente. Este tempo de envelhecimento foi estabelecido medindo-se a turbidez do sol em um turbidímetro (Hanch, 2100P), onde para o tempo de 4h o sol utilizado na preparação do filme de apatita não apresentava precipitações, aglomerações nem gelatinizações. Após esse processo, as amostras de Ti-c.p. sem e com filmes de óxido de titânio contendo titanato de cálcio (sol-gel e PEO) foram imersas no sol e retirado à velocidade de 2 cm/min, hidrolisados sob umidade e temperatura atmosférica por 30 minutos

e pré-calcinados a 250 °C em um forno tipo mufla (EDG, modelo 3P-S) por 15 minutos. Posteriormente, eles foram calcinados a 700 °C por 8 horas no mesmo forno, obtendo-se o xerogel. Estas temperaturas foram estabelecidas com base nos resultados da análise do pó por difratometria de raios X, bem como o método sol-gel utilizado para o recobrimento com hidroxiapatita foi escolhida com base no ponto de carga zero dos substratos (Ti-c.p. modificados), previamente determinados conforme descrito no item 3.2.1 desta seção. Cabe esclarecer que o método sol-gel utilizado no presente trabalho foi modificado do descrito por Niu et. al. (2015). A concentração do sol foi reduzida até um limite, a partir da qual não se observava mais a gelatinização e a precipitação do sol se intensificava. A concentração foi reduzida para proporcionar filmes mais finos de apatita.

As amostras sem e com filmes modificadores foram divididas em 6 grupos, como: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita; (6) Ti-c.p. modificado por PEO com apatita, respectivamente.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

As propriedades estruturais e morfológicas do material, bem como o comportamento corrosivo e mecânico foram estudadas para verificar se as modificações afetam ou não tais propriedades e compreender a relação com o comportamento do material quando submetido aos ensaios biológicos (*in vitro*).

3.2.1 Determinação do Ponto de Carga Zero (PZC ou pH_{PZC})

Através desta caracterização, pretendeu-se obter informações sobre a carga da superfície dos materiais em função do pH do meio e estabelecer condições favoráveis para a deposição do sol de apatitas sobre o substrato. Consistiu em determinar tão somente o valor do pH_{PZC} , a partir do qual pode-se deduzir o sinal algébrico da carga superficial em faixas de pH acima e abaixo do pH_{PZC} .

O ponto de carga zero (PZC ou pH_{PZC}) é o pH em que a adsorção de íons determinantes de potencial (H^+ e OH^-) na superfície de um material é igual.

Um material dispõe de grupos superficiais carregados positivamente e negativamente. Quando o material é colocado em uma solução cujo pH está acima do seu pH_{PZC} ($\text{pH} > \text{pH}_{\text{PZC}}$), há a adsorção de íons OH^- do meio nos grupos positivamente carregado da superfície do material ou processos como os de desprotonação de grupos superficiais para reagir com o OH^- do meio ocorrem. Esses fenômenos resultam na tendência da superfície de exibir carga líquida

mais negativa (ou menos positiva) após a adsorção e/ou reação, bem como na diminuição da concentração de OH^- do meio, ou seja, na diminuição do pH do meio. Por outro lado, se a mesma superfície é colocada em contato com uma solução com o pH menor que o pH_{PZC} ($\text{pH} < \text{pH}_{\text{PZC}}$), isto é, com $[\text{H}^+]$ maior que $[\text{H}^+]_{\text{PZC}}$, a adsorção de H^+ predomina ou processos como os de dessorção de grupos superficiais para reagir com o H^+ do meio ocorrem. Como resultado, há uma diminuição na $[\text{H}^+]$ do meio, ou seja, um aumento no pH, bem como na tendência da superfície do material de exibir carga líquida mais positiva. Atribui-se o fenômeno à predominância de grupos carregados negativamente na superfície que reage com o H^+ do meio, nesta faixa de pH. O pH em que há um equilíbrio entre a adsorção desses íons (H^+ e OH^-) é o PZC ou pH_{PZC} . Este depende da densidade de cargas positivas e negativas intrínsecas no material, sendo que o pH_{PZC} é tanto maior quanto maior a densidade de grupos carregados negativamente na superfície e *vice-versa*.

No presente trabalho, o PZC foi determinado na presença do sal NaCl a 0,01 mol/L. Em cada um dos 7 tubos de falcon foram colocadas 10 mL de soluções contendo cloreto de sódio, NaCl (IMPEX, 37%), à 0,01 mol L⁻¹ em pHs diferentes, que compreendia de 3,0 a 9,0. O ácido nítrico, HNO_3 (J.T.Baker, 69%-70%), e hidróxido de sódio, NaOH (Dinâmica, 98%), diluídos foram utilizados para seu ajuste. O pH foi conferido e medido (pHmetro Phtek, PHS-3B) após a transferência de soluções nos tubos de falcon e estes valores foram assumidos como sendo o $\text{pH}_{\text{inicial}}$. Em seguida, duas peças de Ti-c.p. com dimensão de 1,0 x 1,0 x 0,05cm³ (massa 0,5458 g ± 0,0159) com superfície modificada ou não, foram colocadas em cada tubo de falcon e mantidas num agitador rotativo tipo Wagner (TECNAL, TE-160) (Figura 2). Após 24 h, o pH das soluções foi mensurado, cujos valores foram denotados como pH_{final} . O pH_{PZC} foi determinado colocando-se no gráfico os valores de pH_{final} em função do $\text{pH}_{\text{inicial}}$ e ajustando os dados com uma curva polinomial cúbica para determinar o ponto em que $\text{pH}_{\text{final}} = \text{pH}_{\text{inicial}} = \text{pH}_{\text{PZC}}$ por interpolação. As determinações foram feitas somente uma vez, sendo repetida somente para aquelas que desviram da tendência.

A deposição será bem sucedida se o sol e a superfície do substrato tiverem cargas opostas ou pelo menos se um deles não tiver carga. Cabe esclarecer que embora o método sol-gel utilizado para o recobrimento com apatita foi escolhida com base na determinação do ponto de carga zero dos materiais modificados, o PZC do substrato foi determinado em meio aquoso e o sol foi preparado em etanol, havendo possibilidade de não obter a adesão esperada.

Conforme já mencionado, o procedimento abaixo não nos fornece a magnitude da carga superficial. Proporciona somente o valor do pH_{PZC} , a partir do qual pode-se deduzir o sinal algébrico da carga superficial em faixas de pH acima e abaixo.

Figura 2. Agitador rotativo tipo Wagner.



Fonte autor (2022)

3.2.2 Difractometria de Raios X

Os materiais que constituem os revestimentos foram preparados tanto na forma de filmes como pó para estudar as condições requeridas para obtenção de apatitas. No caso do pó, os dados da difração foram analisados refinando-se a estrutura pelo Método de Pawley.

A difração de raios X (DRX, Método do Pó) foi feita num equipamento da marca Rigaku, modelo D/MAX-2100 da Faculdade de Ciência da UNESP, Campus de Bauru, munido com um filtro de níquel para radiação K_{β} e goniômetro horizontal theta-theta, tendo como fonte a radiação K_{α} do Cu ($\lambda=1,5405\text{\AA}$) gerado a 40kV e 20mA, a fim de analisar as estruturas e fases cristalinas nas amostras em pó de apatita, bem como entender a influência dos tratamentos térmicos nas estruturas. As medidas foram feitas na configuração 2theta/theta, sob passo de $0,02^{\circ}$ e tempo de aquisição de 1 s/passos percorrendo de $5^{\circ} \leq 2\theta \leq 80^{\circ}$. A identificação de fases foi feita usando o software Crystallographica Search-Match que compara os dados experimentais com os dos bancos de dados, *Powder Diffraction File (PDF-2) - International Center for Diffraction Data (ICDD)*. O refinamento estrutural consistiu em determinações do tamanho médio de cristalitos e parâmetros de rede e quantificação de fases, aplicando-se o método de Pawley conforme mencionado acima. O material de referência utilizada para verificar as características instrumentais (radiação utilizada, cintilação do detector etc) foi o CeO_2 , cujo padrão de difração foi gerado nas mesmas condições que do pó de apatita e usado no refinamento.

Para a análise dos filmes modificadores sobre o Ti-c.p., usou um equipamento da marca Bruker D2 Phaser com radiação K_{α} do Cu ($\lambda=1,5405\text{\AA}$) do Instituto de Tecnologia de Materiais/Universidade Politécnica de Valência, Espanha. Os padrões de DRX para a análise foram coletados também no modo 2theta/theta na faixa de $20^{\circ} \leq 2\theta \leq 90^{\circ}$, sob passo de $0,02^{\circ}$ e tempo de aquisição de 8 s/passos. As fases cristalinas foram identificadas também por

comparação com os padrões do banco de dados, *Powder Diffraction File* (PDF-2) - *International Center for Diffraction Data* (ICDD), usando o software *Crystallographica Search-Match*. O refinamento estrutural não foi feito para o caso de filmes.

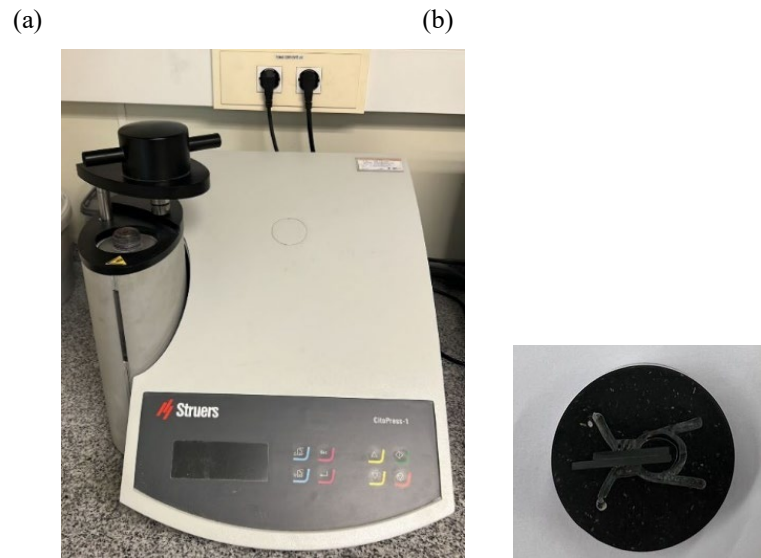
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliação morfológica da superfície das amostras de Ti-c.p. com filmes modificadores, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEV- EC) da ZEISS, modelo Ultra 55, do Serviço de Microscopia Eletrônica da Universidade Politécnica de Valencia (UPV), Espanha. O equipamento era munido de detector de Energia Dispersiva de Raios X (EC-EDX), além do detector de elétrons secundários (SE) e retroespalhados (BSE) (Oxford Instrumentos Ltda. Para gerar as imagens aplicou-se uma tensão de 2,0 kV e para análise composicional a tensão de aceleração foi de 12,5 kV com um tamanho da região focalizada de 0,2 μm . Por se tratar de amostras metálicas, não foram metalizadas com o ouro para a análise.

3.2.4 Quantificação da espessura do filme

Para avaliar a espessura do filme depositado sobre o Ti-c.p., uma preparação metalográfica das amostras (Figura 3) se fez necessária. Inicialmente, foi feito um corte transversal na peça metálica com auxílio de guilhotina (excel machine tools, modelo 3BR4/300). As amostras foram então posicionadas verticalmente com uma presilha em acrílico no centro de um molde cilíndrico em ferro, preenchida com pó de resina termoplástica à base de carbono condutor e aquecidas (Figura 3a), num equipamento de marca Struers, CitoPress-1 (Figura 3a), à 180°C por 3 min. Em seguida, as superfícies foram lixadas com uma sequência de lixas (80, 240, 500, 1.000 e 2.500 mesh), polidas com sílica coloidal com granulometrias de 1 e 0,02 μm em suspensão (Chemomet) em uma politriz automática Struers, LaboPol-5. Por fim, foram lavadas com etanol absoluto, com auxílio de um banho ultrassônico por 15 min, após o qual é feito uma avaliação preliminar usando um microscópio óptico (Nikon, Eclipse LV100) antes de serem analisados num microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEV-EC, Zeiss, Ultra55). A amostra acabada pode ser vista na Figura 3b e foram analisadas sem nenhum processamento.

Figura 3. (a) Equipamento, Struers, CitoPress-1. (b) Amostra embutida na resina.



Fonte autor (2022).

3.2.5 Perfilometria de contato

A análise do perfil topográfico e a quantificação da rugosidade das superfícies foram executadas em um perfilômetro de contato (mecânico) Veeco Dektak, ISSO D150, do Laboratório de Plasmas Tecnológicos – LaPTec, UNESP, Sorocaba. A amostra foi posicionada sobre uma base de platina que foi deslocada horizontalmente, onde uma ponteira de diamante (raio $12,5 \mu\text{m}$) acoplada a um apalpador de formato L varreu a superfície. A variação da textura da superfície gerou movimentação na ponteira. O transdutor de posição converteu os movimentos do apalpador em sinais elétricos de amplitude proporcional à altura das irregularidades. Os sinais foram registrados e foi utilizado posteriormente para traçar o perfil e quantificar a rugosidade. O equipamento é programável para um comprimento de varredura de $2.000 \mu\text{m}$, sendo que a força da ponteira equivalente à 3 mg e profundidade $< 0,16 \mu\text{m}$, com os quais são registrados durante 41 segundos. A partir dos perfis de rugosidade, os parâmetros de rugosidade foram processados automaticamente pelo *software* “default.prog”. Para cada amostra foram realizadas dez medições em diferentes locais da superfície (DE LA CERDA et al., 2020).

A rugosidade da superfície foi quantificada em termos da amplitude de perfil (R_a e R_q). A rugosidade (R_a) é definida como amplitude média, calculada como a média aritmética dos valores absolutos das alturas dos picos num perfil, em relação à linha média (LM). A linha média é uma linha imaginária de referência que divide o perfil de rugosidade em dois hemisférios, de forma que a soma das áreas superiores seja igual à soma das áreas inferiores à

LM (NOVASKI, 2021). No entanto, esse parâmetro apresenta fator limitante por ser um valor médio de amplitude do perfil: diverge quanto às alturas das ondulações, além do risco de apresentar erros em níveis inaceitáveis, por vezes, por não distinguir os picos e dos vales do perfil.

A norma Brasileira NBR 8404/1984 apresenta parâmetros alternativo de rugosidade. A rugosidade média quadrática (R_q), conhecida também como RMS (do inglês, *Root Mean Square*), é a raiz quadrada da média dos quadrados das ordenadas do perfil efetivo em relação à linha média (LM). Seu valor é mais sensível a irregularidades dos picos e vales, ou seja, o quadrado das amplitudes maiores dá um peso maior no cálculo da média das amplitudes. Assim, o efeito das irregularidades reflete mais nos valores do R_q que se afasta da média. Portanto, para um mesmo segmento de uma superfície, a comparação entre os valores de R_a e R_q pode acrescentar alguma informação sobre a variação das irregularidades (CAMARGO; MACHADO, 2015).

3.2.6 Microscopia de Força Atômica

O microscópio de força atômica (AFM) Bruker, modelo Multimode 8, do Serviço de Microscopia Eletrônica da Universidade Politécnica de Valencia (UPV), Espanha, fornece imagens em alta resolução tridimensional da topografia da superfície a nível atômico, na ordem de nanômetros, e quantifica também a rugosidade da superfície. Com a intenção de não danificar a superfície da amostra, foi escolhida uma ponteira de silício com raio 5 nm, modelo VTESPA-300, de formato retangular operando sob modo intermitente (*tapping*), com frequência de ressonância de 268 kHz, dimensão máxima de 25,0 μm e profundidade máxima de 5,104 μm . As imagens e dados obtidos foram processados pelo *software* NanoScope 8.10, da BRUKER.

A interação local entre a ponteira acoplada em uma haste flexível “catilever” na superfície de uma amostra, quantifica de forma direta a rugosidade média (microestrutura dos materiais) da superfície. À medida que a ponteira varre uma amostra, geram forças interatômicas de atração (tipo de forças de Van der Waals) e repulsão coulombiana. Com deslocamento da ponteira sobre a superfície da amostra, é produzida uma deflexão da haste, que é medida por métodos ópticos, mais especificamente por um feixe de Laser, que reflete specularmente na parte de trás da haste e incide sobre um fotodetector. Ao medir a posição do feixe refletido em cada quadrante, os deslocamentos da ponta na direção z podem ser determinados. Em um microscópio operando sob modo *tapping*, a ponteira oscila sobre a superfície da amostra, tocando-a periodicamente, porém a movimentação é realizada com a

ponteira no ar e, por isso, as forças de atrito entre a ponteira e amostra é reduzida, minimizando a deformação da amostra que ocorreria no modo de contato (FREITAS et al., 2018).

Imagens do AFM de diferentes superfícies são usadas como dados qualitativos. O comprimento varrido, o escalonamento dimensional e material da ponteira que estão em nível de nanoescala diferem dos do perfilômetro mecânico assim como o perfil encontrado, o que traz divergência na quantificação dos parâmetros deduzidos dos perfis capturados (MYSHKIN et al., 2003). No entanto, há correlação dos parâmetros, de rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq) dependendo da amostragem.

3.2.7 Molhabilidade, ângulo de contato e energia de superfície

A molhabilidade da superfície é estudada determinando-se valores de ângulos de contato formado entre um líquido em gota com uma superfície sólida, em um meio inerte (gás) (GITTEMS et al., 2013). A medição do ângulo de contato de uma gota sésil de um solvente foi realizada por um goniômetro da KRÜSS ADVANCE, modelo Drop Shape Analyzer - DSA25, do laboratório Pulvimat do Instituto de Materiais da Universidade Politécnica de Valência, Espanha. O equipamento é composto de uma fonte de luz, uma câmera de captura de imagem e um gotejador eletrônico capaz de controlar o sistema de dosagem da gota. Através das imagens, a versão automatizada ajusta os contornos às gotas pendentes e sésseis, seguindo o método de Elipse Tangencial, e uma linha de base. O software ADVANCE possui recurso de ajuste automático e estima o ângulo entre a gota e a linha de base.

Pelo ângulo de contato com uma gota de água (altamente polar) avalia-se a hidrofiliabilidade e/ou hidrofobicidade da superfície. A literatura cita que ângulo de contato entre 0° e 90° representa superfícies com alta molhabilidade, e considera as superfícies hidrofílicas. Quando forma ângulo maiores que 90° , é considerado que o líquido não molha a superfície sendo, portanto, hidrofóbicas (NAKAJIMA, 2011).

A relação do molhamento da superfície com as forças adesivas exercidas entre o líquido e a superfície e as forças de coesão do líquido, pode-se quantificar a energia de superfície do sólido (FERRARIS et al., 2016). A importância desse parâmetro está na absorção de proteínas e biomoléculas na superfície do biomaterial, que afeta a resposta celular. Cabe salientar que, o grau de hidrofobicidade/hidrofiliabilidade da superfície e a energia superficial requeridos dependem do tipo de célula a ser utilizada.

A escolha dos líquidos de polaridade diferente é essencial para determinar a energia superficial do material. Em geral, usa-se o diiodometano, além da água, cujos componentes apolar e dispersivo da tensão superficial são distintos dos da água.

Sob velocidade 2,67 $\mu\text{L/s}$, um volume de 2,0 μL de água ou diiodometano foi gotejado sobre a superfície do material e o ângulo de contato foi medida cinco vezes. O ângulo é calculado como a média e desvio padrão dessa medida. Foi aguardado um tempo de cerca de 10 minutos para que o líquido evaporasse completamente e uma nova gota foi depositada sobre outro ponto da superfície para a nova medida. A medida foi feita em três regiões diferentes para cada amostra e cada líquido.

A partir do ângulo de contato encontrado (molhamento da superfície), valores conhecidos de tensão superficial e componentes de polar e dispersiva de água (altamente polar) e do diiodometano (líquido dispersivo e apolar), cujos valores encontrados na literatura estão listados na Tabela 1, o software ADVANCE calcula automaticamente a energia de superfície do sólido (γ_s). O software utiliza o modelo de OWRK (Owens, Wendt, Rabel e Kaelble) para o cálculo.

Tabela 1. Componentes da tensão de superfície dos líquidos indicadas pelo software ADVANCE.

Líquidos	(γ_L) Tensão superficial [mN/m]	(γ_L^D) Dispersiva [mN/m]	(γ_L^P) Polar [mN/m]
Água	72,3	18,7	53,3
Diiiodometano	50,3	50,8	0

O modelo OWRK baseia sua teoria na aproximação de Fowkers, que relaciona o cosseno do ângulo θ de contato da superfície do substrato com os líquidos com os componentes da tensão superficial do líquido e coordenadas da tensão do substrato (ver equações 1 e 2), conforme:

$$\gamma_{L(\text{água})} \cdot (1 + \cos\theta_{(\text{água})}) = 2\sqrt{\gamma_S^D} \cdot \sqrt{\gamma_{L(\text{água})}^D} + 2\sqrt{\gamma_S^P} \cdot \sqrt{\gamma_{L(\text{água})}^P} \quad (1)$$

$$\gamma_{L(\text{diiiodomet})} \cdot (1 + \cos\theta_{(\text{diiiodomet})}) = 2\sqrt{\gamma_S^D} \cdot \sqrt{\gamma_{L(\text{diiiodomet})}^D} + 2\sqrt{\gamma_S^P} \cdot \sqrt{\gamma_{L(\text{diiiodomet})}^P} \quad (2)$$

onde: γ_L é tensão superficial total do líquido; γ_L^D é componente dispersivo da tensão superficial do líquido; γ_L^P é componente polar da tensão superficial do líquido (COELHO et al., 2012). Assim, segundo modelo, a energia de superfície do sólido (γ_s) pode ser determinada como soma dos componentes dispersivo (γ_s^D) e polar (γ_s^P) do sólido, conforme a equação abaixo, sendo cada componente determinados pelas equações 1 e 2, respectivamente.

$$\gamma_s = \gamma_s^D + \gamma_s^P \quad (3)$$

3.2.8 Ensaio de corrosão

Para avaliar a susceptibilidade à corrosão das amostras com e sem modificação (lixadas e tratadas com HCl), foi feito o estudo de corrosão eletroquímica usando potenciostato/galvanostato da marca Metrohm, PGSTAT204. O estudo consistiu das medidas de potencial de circuito aberto (OCP) e ensaio de polarização potenciodinâmica ao ar, seguindo-se as normas estabelecidas pelo F2129-01 (ASTM INTERNATIONAL ASTM F 2129-01., 2008), em uma solução Ringer-Hartmann a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, mantido nessa temperatura por aquecimento por uma lâmpada. Tanto a temperatura foi ajustada para $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ como o pH, para $6,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$, para ajustar-se às condições da aplicação biológica pretendida.

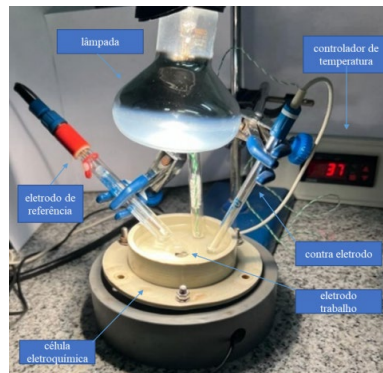
A solução Ringer-Hartmann (saliva artificial) foi preparada dissolvendo-se em ordem os seguintes compostos (Tabela 2) em 1 L de água destilada.

Tabela 2. Composição da solução Ringer-Hartman.

Ordem dissolvida dos Compostos	Substâncias e proveniência	Quantidade (g/L)
1	NaCl (Scharlau, 99,5%)	5,7
2	KCl (Scharlau, 99,5%)	0,358
3	CaCl ₂ (Scharlau, 96%)	0,224
4	C ₃ H ₅ NaO ₃ (Scharlau, 50%)	4,956

Utilizou-se uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, sendo o eletrodo de referência o de Ag/AgCl, em KCl à 3 mol/L, um contra eletrodo de platina de 0,5 cm² de área geométrica e o eletrodo de trabalho era o material objeto desse trabalho, colocada por baixo da célula pressionando um *o-ring* que delimita a área geométrica ativa em 0,785 cm². Assim, os potenciais serão todos expressos em relação ao do eletrodo de referência de Ag/AgCl, em KCl à 3 mol/L, e a corrente, normalizada por área geométrica em 0,785 cm². A foto do sistema montado pode ser vista na Figura 4.

Figura 4. Montagem da célula eletroquímica utilizada nos ensaios de corrosão.



Fonte autor (2022).

O OCP foi medido por 3600 s (ou seja, 1h). Em seguida, a curva de polarização foi levantada entre -1,0V a 3,0V vs Ag/AgCl com varredura à 0,002 V/s, totalizando 7899 s (2h20) de medida.

Parâmetros como o potencial de corrosão (E_{corr}), densidade de corrente de corrosão (i_{corr}) e inclinações de Tafel (ramo anódico, b_a , e catódico, b_c) foram determinados a partir da curva de polarização usando o software Wolfram Mathematica 12.1. A resistência de polarização (R_p) e taxa de corrosão (C_r , em unidades de penetração) foram calculadas por meio das equações abaixo.

$$R_p = \frac{b_a |b_c|}{2,3 i_{corr} (b_a + |b_c|)} \quad (4)$$

$$C_r = 3,27 \frac{a \cdot i_{corr}}{nD} \quad (5)$$

Na equação, b_a e b_c são os coeficientes angulares (inclinação de Tafel em V/dec) das curvas “E versus log |i|” quando há predomínio de processos anódico e catódico, respectivamente, i_{corr} é a densidade de corrente de corrosão (A/cm^2), a é a massa atômica (47,9 g/mol para titânio), n é a mudança na valência da espécie sob corrosão ($n=4$) e D é a densidade do metal ($4,51 g/cm^3$ para titânio). A taxa de corrosão (C_r) é calculada considerando a lei de Faraday e assumindo que a dissolução é uniforme (ALVES et al., 2017). Os detalhes dessa técnica de caracterização podem ser vistos no apêndice.

3.2.9 Ensaio Mecânico

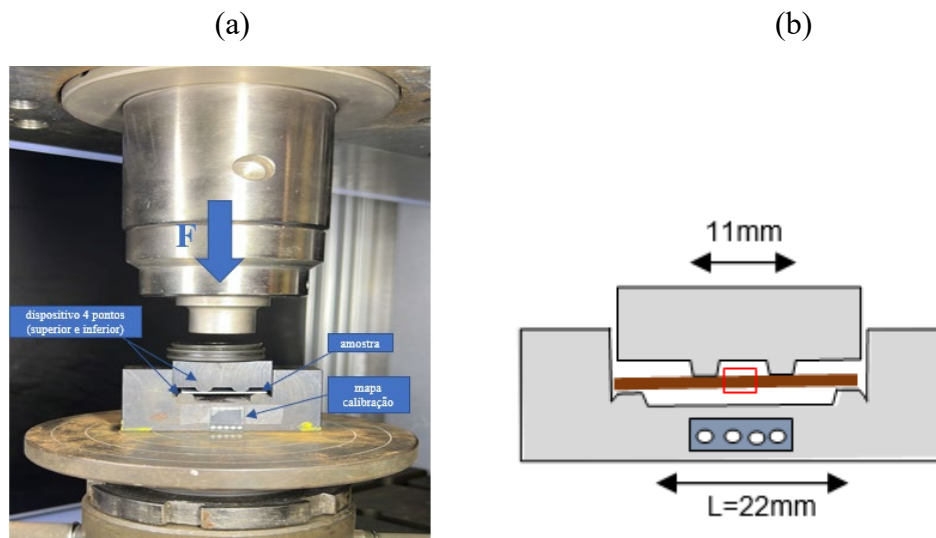
As amostras com e sem filmes modificadores foram submetidos aos ensaios de flexão de quatro pontos em um equipamento universal de ensaios Shimadzu Autograph AG-100kN Xplus, disponível no Laboratório de Pulvimetalurgia do Instituto de Materiais da Universidade Politécnica de Valência, Espanha, respeitando o limite para a não ruptura. Esse ensaio mecânico foi empregado para estudar a influência dos tratamentos, aos quais foram submetidos para a obtenção dos filmes, nas propriedades mecânicas de Ti-c.p. e está em acordo com as normas ASTM E8 (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS ASTM E855-08, 2004).

O ensaio permitiria analisar a adesão dos filmes modificadores, se medidas de propagação/emissão acústica fossem feitas simultaneamente. No presente estudo, a adesão foi analisada qualitativamente por um microscópio ótico, marca NIKON Eclipse LV 100, operando com o software: Nis-Elements Ar 4.10.04 64 bit, após o ensaio de flexão.

As amostras analisadas apresentam valores de espessura de 1,00 mm (D, da equação 7, adiante). Quanto ao comprimento e a largura da amostra, variaram de 24,5 a 30,5 mm no comprimento (b, da equação 6) e entre 3,0 e 3,81 mm na largura.

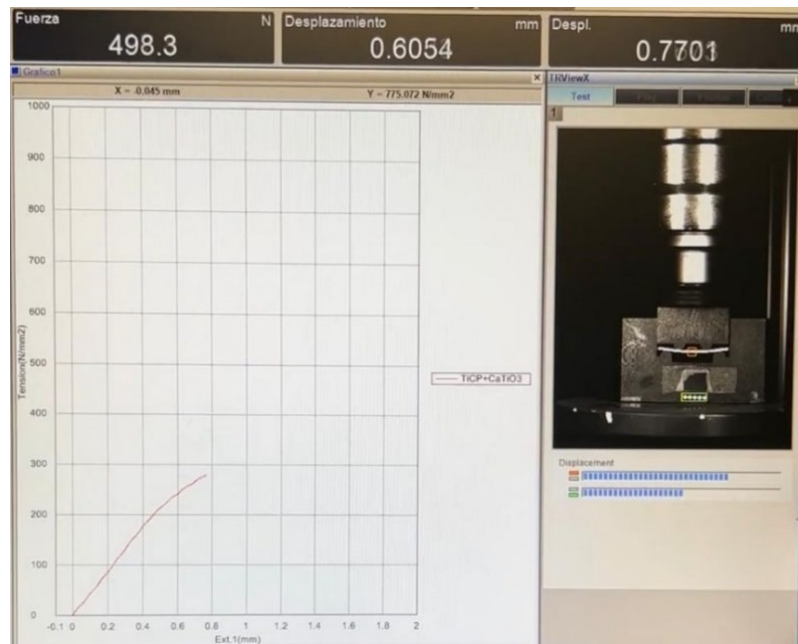
As amostras foram inseridas em um dispositivo de quatro pontos entre dois suportes, inferior e superior, ambos com dois pontos de apoio cada em posições alternadas, conforme mostra a Figura 5b. Os dados foram coletados e tratados pelo software Trapezium X (Figura 6). O software reconhece a parte do dispositivo de quatro pontos (parte superior e inferior) iniciando pelo reconhecimento do “mapa de calibração”, indicado na Figura 5a, que é uma espécie de “prumo de centro”. Com base nesse mapa, o equipamento posiciona o dispositivo de quatro pontos no seu centro e o software identifica como posição inicial da amostra (ver retângulo vermelho na Figura 5b). As dimensões da amostra são mencionadas no início do teste, que deverão ter valores próximos à dimensão da cavidade (porta-amostra) do dispositivo. Esta padronização de tamanho da amostra permite a boa reprodução dos resultados. O ensaio inicia aplicando uma força de 0 N que aumenta lentamente durante a análise de tal forma que proporcione uma taxa de deslocamento de 0,5 mm/min em temperatura ambiente. Os valores de força requeridos para proporcionar tal taxa de deslocamento são registrados continuamente.

Figura 5. (a) Montagem esquemática do dispositivo para ensaio de flexão de quatro pontos; (b) Ilustração para a identificação do mapa de calibração do dispositivo.



Fonte autor (2022).

Figura 6. Imagem do ensaio de flexão de quatro pontos no *software* Trapezium X.



Fonte autor (2022).

Aplicando a equação 6 e 7 é possível transformar a curva de força *versus* deslocamento em uma curva de tensão *versus* deformação, a fim de obter parâmetros como o módulo de elasticidade e tensão máxima de flexão.

$$\sigma \left(\frac{\text{N}}{\text{mm}^2} \right) = \frac{0,75 FL}{b \cdot h^2} \quad (6)$$

$$\varepsilon \left(\frac{\text{mm}}{\text{mm}^2} \right) = \frac{4,36 Dh}{L^2} \quad (7)$$

onde σ é a tensão, ε é a deformação, F é a força aplicada em todo suporte superior, L é o comprimento entre os apoios inferiores do dispositivo (22 mm neste caso), b é o comprimento da amostra (Figura 5b), h é a espessura do corpo de prova (1mm, neste caso) e D é o deslocamento para a deformação da amostra (medido pelo software).

Demais parâmetros são difíceis de calcular e comparar, em virtude dos diferentes materiais que constituem as amostras, pelo menos com os protocolos de ensaio escolhido. Ambas as equações são válidas para ensaio em que os pontos de apoios dos suportes inferior e superior são equidistantes com distâncias entre os suportes inferiores de 22 mm e superiores a distância de 11 mm (Figura 5b). Para que não ocorresse a ruptura da amostra, o ensaio foi paralisado antes de atingir a tensão máxima, pré-estabelecendo-se para isso que o deslocamento da amostra fosse no máximo de 1,0 mm. Assim a amostra é revertida ao seu estado inicial após a remoção da força e a adesão foi analisada de forma qualitativa por microscopia ótica após o ensaio. O módulo elástico em flexão descreve a resistência de um material quando forças de

flexão são empregadas, dentro da faixa elástica e é determinado a partir da curva tensão *versus* deformação, extraindo-se o coeficiente angular da melhor reta tangente da região de comportamento elástico.

3.2.10 Força de Adesão

A força de adesão, dos filmes modificadores com substratos de titânio, foi medida por *pull off* utilizando-se um equipamento portátil da marca Defelsko, modelo PosiTest ATD, série AT03666. Este é classificado como teste direto de adesão e consta das normas ISO 4624/16276-1 e ASTM D4541/D7234. No filme (superfície modificada) preparado sobre o substrato no tamanho de 2,5 cm por 3,0 cm, colou-se um *dollie* em alumínio de 20 mm de diâmetro com Adesivo Epoxi da marca Scotch 3M. Após um período de pelo menos 48h de cura da cola em temperatura ambiente, uma bomba hidráulica, conectada ao cone de sucção, foi colocada para exercer um vácuo crescente na coluna que succiona o *dollie* até destacar o filme do substrato metálico. Após a remoção, a fratura foi analisada e classificada em fratura adesiva, quando a camada do revestimento é totalmente destacada, e coesiva, quando a fratura ocorre dentro da camada de revestimento.

Preparou-se 2 amostras de cada espécimes e a força de adesão foi calculada como a média de duas medidas, para verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Os valores da força de adesão foram também normalizados e expressos por área geométrica da superfície estudada.

A reprodução dos ensaios foi crucial para avaliar a consistência e confiabilidade dos resultados e a inspeção utilizando um microscópio digital 1600x (Handhel Magnification) e a descrição das fraturas após a finalização do ensaio desempenharam um papel importante para avaliar a adesão.

3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Todos os ensaios deste trabalho foram feitos utilizando as células de pré-osteoblastos de camundongos, MC3T3-E1 (subclone 4), adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*). Os ensaios consistiram da análise de: (i) viabilidade e adesão celular; (ii) morfologia celular; (iii) expressão gênica; (iv) diferenciação celular e mineralização e (v) análise zimográfica.

Os ensaios de viabilidade e adesão foram feitos para avaliar a biocompatibilidade e identificar possíveis efeitos citotóxicos dos materiais e modificações, onde dois métodos foram

aplicados: por contato direto (células plaqueadas diretamente na superfície dos materiais) e contato indireto (células plaqueadas com meio condicionado pelos materiais, seguindo as diretrizes da ISO 10993-5). A combinação desses ensaios fornece uma visão abrangente dos efeitos dos materiais nas células.

Para a análise da compatibilidade, a morfologia das células cultivadas em contato direto com as amostras modificadas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As análises de expressão gênica foram feitas por meio de Reação em Cadeia da Polimerase, quantitativa e em tempo real (*RT-qPCR*, do inglês *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*).

A análise da diferenciação foi feita estimando-se a atividade da enzima Fosfatase Alcalina (Alp) por um método de coloração.

A mineralização foi estudada *in vitro* avaliando a capacidade de incorporação de cálcio à matriz sintetizada pelos osteoblastos através da marcação com o vermelho de Alizarina.

Por fim, a zimografia foi utilizada para detectar e quantificar proteases (metaloproteinases de matriz, MMPs), por análise de sua atividade enzimática.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular (LaBio) do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu. Os grupos foram separados em controle e as diferentes superfícies modificadas identificadas pela numeração de 1 a 6 como descrito anteriormente.

3.3.1 Cultura celular

As células de pré-osteoblastos de camundongos, MC3T3-E1 (subclone 4), adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*), foram cultivadas em meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) (Vitrocel, Campinas, SP, Brasil) e mantidas em uma incubadora a 37°C em atmosfera de ar contendo 5% em CO₂. As passagens subconfluentes foram tripsinizadas e a suspensão celular de 5×10^4 células/mL foi usada em todos os experimentos deste estudo (ZAMBUZZI et al., 2011).

3.3.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, onde através da redução do sal brometo de dimetiltiazol difenil tetrazólio (MTT) pelas mitocôndrias das células viáveis obtém-se um produto de coloração roxa, cuja intensidade é usada para relacionar com a viabilidade.

Para o método de análise por contato direto, as células (5.000 células/poço) foram plaqueadas diretamente sobre as peças de titânio (dimensão de 1,0x1,0x0,05 cm³), com superfícies modificadas ou não, em placas de cultura de células de 24 poços. Após 72 horas de cultura em meio suplementado, as peças de Ti-c.p. contendo as células foram transferidas para uma nova placa de 24 poços e lavadas com tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*). Acrescentou-se então 100µL da solução de MTT (Sigma, à 1mg/mL) e incubados por mais 3 horas em estufa a 37°C. Ao fim desse período, retirou-se o meio contendo o sal excedente e adicionou-se 100 µL de etanol absoluto para solubilização do corante azul (cristais de formazan) formado pela reação do MTT com as desidrogenases mitocondriais das células viáveis. O produto solubilizado foi transferido quantitativamente para uma placa de 96 poços e, finalmente, a leitura da densidade ótica (D. O.) foi realizada em um leitor de microplacas (SYNERGY-HTX, Biotek, EUA) como absorvância da radiação de 570 nm (ZAMBUZZI et al., 2011). Cabe esclarecer que a viabilidade aqui quantificada se refere às células que estiveram em contato por 72 h com 1,0 cm² de Ti-c.p., com superfície modificada ou não, ao passo que, no caso do controle, a área em contato com as células foi de 1,9 cm² (área do fundo dos poços).

Para o método de contato indireto, as células foram semeadas inicialmente em placas de 96 poços (5.000 células/poço) e mantidas à 37°C ao ar contendo 5% de CO₂. Após 24 h, o meio foi substituído pelo meio condicionado por cada material [condicionamento ocorreu por 24 h em meio sem o soro fetal bovino (FBS), seguindo as normas ISO 10993-5, sendo suplementado com FBS após o condicionamento]. Ao fim do período de incubação de 72 h, retirou-se o meio, as células foram lavadas com PBS e então 100µL da solução de MTT por poço foram acrescentados para serem incubados por mais 3 horas em estufa a 37°C. O sal excedente foi retirado e 100 µL de etanol absoluto, acrescentado para solubilização do corante azul (cristais de formazan). O produto solubilizado foi transferido quantitativamente para uma nova placa de 96 poços para a leitura da densidade ótica (D. O.), realizada em um leitor de microplacas (SYNERGY-HTX, Biotek, EUA) como absorvância da radiação de 570 nm (ZAMBUZZI et al., 2011).

3.3.3 Adesão celular

O ensaio de adesão celular é importante para avaliar a capacidade das células de formarem uma interação de adesão com as superfícies de substratos e adaptarem-se ao meio. É especialmente útil para relacionar com fatores como a presença de moléculas de adesão,

composição da matriz extracelular, densidade de células e morfologia celular. O ensaio foi realizado pelo método de Cristal Violeta, seguindo-se o mesmo padrão de procedimento do ensaio de MTT para contato direto e indireto. Este ensaio consiste da coloração do reagente cristal violeta pelo ácido desoxirribonucléico das células viáveis. Após 72 horas de tratamento, o meio foi retirado e a solução de ácido acético com etanol absoluto (3:1 v/v) adicionada, mantendo-a por 10 minutos. Em seguida a solução fixante foi retirada, o Cristal Violeta 0,1% (p/v) adicionado e deixado em repouso por mais 10 minutos. A solução contendo o excedente do corante foi retirada, o tapete celular lavado com PBS e, por fim, foi adicionado 100 µl de ácido acético (10%). A solução sobrenadante foi transferida quantitativamente para uma placa de 96 poços e a adesão foi avaliada em termos de densidade óptica medida a 540 nm utilizando o mesmo leitor do experimento anterior.

3.3.4 Morfologia celular

Para avaliar a aderência, morfologia e citotoxicidade para os pré-osteoblastos (MC3T3-E1) cultivados em contato com as amostras modificadas, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) FEI, Quanta 200 no Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu (CME-IBB), munido de detector de Energia Dispersiva de Raios X (EDX, Oxford Inca 250P20), além do detector de elétrons secundários (SE) e retroespalhados (BSE). Para gerar as imagens aplicou-se uma tensão de 12,5 kV e para análise composicional a tensão de aceleração foi de 20,0 kV. As amostras com células foram processadas, conforme o procedimento abaixo, antes de serem metalizadas com ouro e analisadas.

Inicialmente, as células foram semeadas nas diferentes superfícies de titânio em placas de 24 poços nas mesmas condições descritas anteriormente, sendo os meios substituídos a cada 3 dias, para manter as propriedades biológicas. Após 7 dias, as amostras foram fixadas com glutaraldeído à 2,5% e desidratadas em soluções aquosas de etanol com concentrações crescentes [7,5% (2x10min), 15% (2x10min), 30% (2x10min), 50% (2x10min), 70% (3x15min), 90% (2x15min) e 100% (2x10min)]. Foram então submetidas à secagem acima do ponto crítico em CO₂ e, finalmente, metalizadas para serem analisadas sob as condições descritas no parágrafo acima.

3.3.5 RT-qPCR

As análises de expressão gênica foram realizadas por meio de Reação em Cadeia da Polimerase, quantitativa e em tempo real (*RT-qPCR*, do inglês *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*).

As células expressam as suas necessidades na forma de ácidos ribonucléicos mensageiros (mRNAs), processo conhecido como transcrição. Em outras palavras, induzido pelo meio em que elas crescem, porções do seu DNA (ácido desoxiribonucleico) genômico são impulsionadas a serem transcritas, ou seja, parte composta por uma sequência específica de desoxiribonucleotídeos contendo um código (instruções) para produzir uma proteína que desempenha uma função específica no organismo são ativados para que à partir de uma das fitas dessa parte (a fita molde) uma molécula de RNA complementar (que viria a ser o mRNA) seja sintetizada (transcrita). Esta parte do DNA é conhecida como “gene”. Uma célula humana possui mais que 25 mil genes. Após a transcrição ocorreria a tradução, que seria o processo pelo qual as proteínas são sintetizadas baseando-se nos códigos dos mRNAs. Essa síntese (tradução) é também controlada por complexos sistemas de regulação.

O *RT-qPCR* consiste da amplificação *in vitro* dessas regiões específicas (genes) do ácido desoxiribonucleico (DNA) de onde os mRNAs foram transcritos, ou seja, aumentar o número de cópias destas regiões expressas na forma de mRNA a fim de se ter material suficiente para identificar e quantificar os genes expressos. Os genes alvos dessa pesquisa foram 13: *Integrina- α 1*, *Integrina- β 1*, *Fak* (Quinase de Adesão Focal), *Cofilina*, *Col3 α 1* (colágeno tipo III), *Bsp* (sialoproteína óssea), *Otc* (Osteocalcina), *Timp 1*, *Timp 2* [membros da família dos inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz (Mmps) que inclui Timp1, Timp2, Timp3 e Timp4], *RunX2* (fator de transcrição 2 relacionado a runt), *Mmp-2*, *Mmp-9* (metaloproteinases de matriz) e *Vegf* (fator de crescimento endotelial vascular). Cabe esclarecer que *qPCR* assinala se os genes foram expressos e não se as proteínas alvo foram sintetizadas (traduzidas, que para isso são necessárias as análises por Zimografia ou *Western Blot*).

Em tempo, o Comitê da Nomenclatura de Gene (HGNC) da Organização do Genoma Humano (HUGO) (SPLENDORE, 2005) estabelece que utilizem letras maiúsculas e em itálico para os nomes de genes humanos. Para os nomes de genes homólogos de camundongos (genes murinos) se deve utilizar a primeira letra em maiúscula seguida de letras minúsculas, todos em itálico. Os nomes das proteínas são escritos da mesma forma, somente sem a grafia em itálico.

A Integrina α , Integrina β , Fak, Cofilina e Col3a1 são proteínas envolvidas na adesão celular à matriz extracelular e no remodelamento do citoesqueleto (Actina) (SEBÉ PEDRÓS,

2011). As Integrinas α e β formam heterodímeros que ficam na membrana e se ligam aos componentes da matriz extracelular, como o Colágeno tipo III (GHARIBI et al., 2017). Essa interação desencadeia (cascata de eventos) na formação de complexos de adesão focal, onde a Fak é recrutada e desempenha um papel crucial na sinalização intracelular. A ativação da Fak, via fosforilação, estimula vias de sinalização que afetam a migração celular, a sobrevivência e o remodelamento da matriz (PARSONS et al., 2000). A Cofilina, que está no final dessa cadeia de sinalização, regula a dinâmica do citoesqueleto de actina, promovendo sua reorganização e influenciando a formação de estruturas de adesão (CONDEELIS, 2001). Além disso, o colágeno tipo III, codificado pelo gene *Col3a1*, interage com a Integrina α , contribuindo para a adesão celular à matriz extracelular e à organização dessa matriz (RICARD-BLUM, 2011). As proteínas citadas neste parágrafo são todas envolvidas na adesão celular e remodelamento da matriz extracelular e citoesqueleto.

As metaloproteinases de matriz (Mmps) são enzimas que têm a capacidade de degradar a matriz extracelular (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001). A Mmp2 está envolvida na remodelação e *turnover* da matriz óssea, enquanto a Mmp9 está associada tanto à reabsorção óssea quanto à formação óssea (COUSSENS, FINGLETON, MATRISIAN, 2002). Por outro lado, os Timps são inibidores naturais das Mmps e atuam regulando sua atividade (NAGASE; VISSÉ; MURPHY, 2006). O Timp1 e o Timp2 são dois desses inibidores que desempenham um papel crítico na manutenção do equilíbrio entre a formação e a degradação da matriz óssea, prevenindo a ação excessiva das Mmps (VISSÉ; NAGASE, 2003). A interação entre os genes dessas enzimas ocorre em um sistema regulatório complexo onde a interação equilibrada entre Mmps e Timps é essencial para o controle adequado da degradação da matriz extracelular e manutenção do ambiente ósseo (STETLER-STEVENSON, 2008).

A interação dos genes *Bsp*, *Runx-2* e *Otc* desempenha um papel crucial na formação óssea (LEHMANN et al., 2023). O *Runx-2* é um fator de transcrição essencial para a diferenciação em osteoblastos, regulando a expressão de genes importantes na formação óssea (TU et al., 2008). O gene *Bsp* codifica a sialoproteína óssea, que contribui para a mineralização adequada da matriz óssea. Já o gene *Otc* codifica a osteocalcina, uma proteína envolvida na regulação do metabolismo do cálcio e na estabilização dos cristais de hidroxiapatita na matriz óssea (ADWAN; BÄUERLE; BERGER, 2004). Essa interação coordenada entre os genes de *Runx-2*, *Bsp* e *Otc* é fundamental para a formação óssea adequada, garantindo a diferenciação e a função dos osteoblastos, a mineralização da matriz e a regulação do metabolismo do cálcio.

Já a expressão do *Vegf* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) está associada à revascularização, garantindo o suprimento adequado de sangue e nutrientes ao tecido. O *Vegf*

é secretado por células osteoblásticas em resposta a condições como hipóxia (deficiência de oxigênio, um aceptor de elétrons), lesão e inflamação. Ele estimula a proliferação e migração de células endoteliais, aumenta a permeabilidade vascular e promove a formação de estruturas tubulares. Essa interação coordenada entre os genes é fundamental para a adesão celular, sinalização intracelular e a remodelação da matriz extracelular, bem como para a diferenciação, mineralização da matriz e vascularização (SILVA et al., 2018).

Quanto ao ensaio, as células foram inicialmente semeadas em placas de cultura de 06 poços e em triplicata com o meio suplementado e após aguardar 24 h para a adesão, à 37 °C ao ar contendo 5% de CO₂, tiveram os meios substituídos pelos meios condicionados com cada material. A preparação do meio condicionado ocorreu pela imersão dos materiais por 24 h em meio sem foro fetal bovino (FBS), seguindo as normas ISO 10993-5, e suplementado com o FBS antes de alimentar a cultura de células. Foram assim mantidas por 14 dias, sendo que os respectivos meios condicionados foram substituídos a cada 3 dias para manter as propriedades biológicas. Foram utilizados também dois controles: um em que se expôs ao meio sem condicionamento e o outro, exposto ao meio sem o condicionamento, mas contendo indutores osteogênicos (MO), ou seja, com β-Glicerofosfato dissódico (10 mmol/L), Dexametasona (0,03 g/mL) e Ácido Ascórbico (50µg/mL) (todos da Sigma-Aldrich). Ambos foram suplementados com FBS antes de serem adicionados ao meio de cultura ou na substituição a cada 3 dias.

Ao fim do período de incubação de 14 dias, as células foram coletadas (respeitando-se os grupos) e, usando o kit Ambion TRIzol Reagent (Life Sciences - Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), tiveram seus RNAs extraídos da seguinte maneira. Após adicionar Ambion TRIzol, foram macerados, centrifugados e a fase transparente, coletada. Os RNAs foram precipitados com isopropanol, centrifugados novamente e dissolvidos em água. Antes da transcrição reversa, o extrato foi ainda tratado com DNase I (Invitrogen, Carls-band, CA, EUA), para degradar qualquer DNA genômico que nele persistiram, e aquecido a 65°C para a inativação da DNase I. Em seguida, a síntese do DNA complementar (cDNA) à partir dos mRNAs presentes nas amostras foi realizada usando o *Kit* de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Consistiu da adição das soluções do *kit* mencionado no extrato livre de DNA genômico, aquecimento à 37°C por 120 min (temperatura indicada para a transcrição reversa) e posterior aquecimento à 80°C por 5 min (para a degradação dos RNAs e dois dos componentes do *kit*: transcriptase reversa e *primer* randômico), num termociclador da Thermo Fischer, QuantStudio 3. Com isso, as porções do DNA genômico que foram expressas foram transcritas reversamente em cDNA, sendo sua quantidade proporcional à expressão. A concentração dos cDNAs em cada amostra

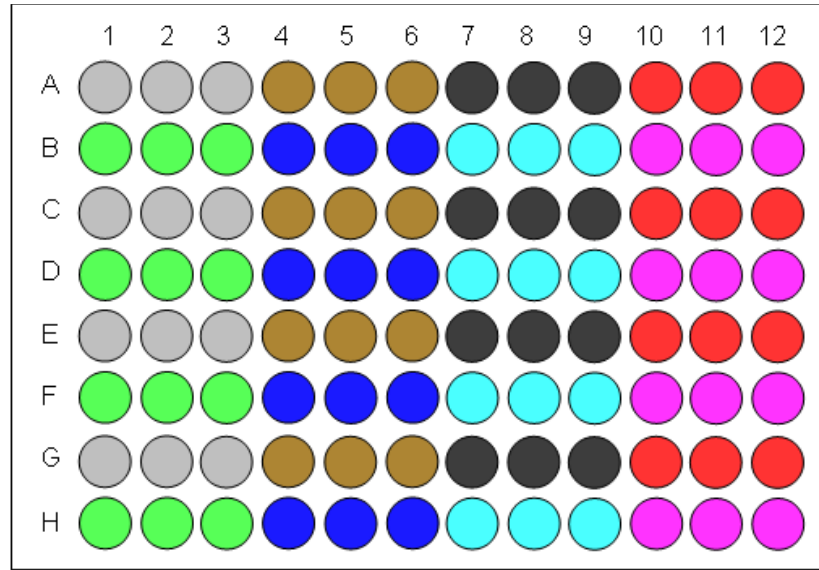
foi determinada por espectrofotometria (Nano Drop) medindo-se a absorvância no comprimento de onda onde o coeficiente de extinção ($\epsilon_{260} = 0,02\text{mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de DNA é máximo (260 nm) e usando a relação de Lambert-Beer. É comum que as amostras de ácido nucleico estejam contaminadas com outras moléculas (proteínas, compostos orgânicos, outros). A razão entre absorvâncias a 260 nm e 280 nm fornece a pureza em DNA, sendo que valores entre 1,4 e 2,0 indicam pureza adequada nas extrações.

Terminada essa etapa, o *q-PCR* foi realizado utilizando um *kit* Go Taq® *q-PCR* Master Mix Sybr Green (Promega) e iniciadores específicos (ou *primers*, da EXXTEND, Campinas-SP). O *kit* é composto da enzima Taq DNA polimerase, cofator enzimático, intercalante Sybr Green, MgCl_2 , dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados) e tampão. Em cada poço de uma placa especial para *PCR* de 96 poços foram colocados 5 μL da solução do *kit* acima, 3 μL de água, 50 ng da amostra de cDNA e 1 μL de cada iniciador específico (0,4 $\mu\text{mol/L}$), sendo todos feitos em triplicata. A Figura 7 mostra o esquema do conteúdo de cada poço, sendo que foram preparadas 4 placas no total para analisar os 16 genes.

A respeito dos 50 ng de cada amostra de cDNA, foram originados pela transcrição reversa dos mRNAs presentes no extrato das células de pré-osteoblastos (MC3T3-E1, Subclone 4) após 14 dias de exposição em cada um dos meios condicionados com: (cinza) controle; (marrom) meio osteogênico; (preto) Ti-c.p.; (vermelho) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (verde) Ti-c.p. modificado por PEO; (azul royal) Ti-c.p com apatita; (azul claro) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (magenta) Ti-c.p modificado por PEO e apatita.

Quanto ao 1 μL do iniciador específico (*primers*), por exemplo, em todos os poços das filas A e B foram adicionados iniciadores da *Integrina $\alpha 1$* ; nos das filas C e D, iniciadores da *Integrina $\beta 1$* ; filas E e F, iniciadores da *Fak* e filas G e H, iniciadores do gene endógeno *Gapdh*. Foram preparadas 4 placas similares da mesma maneira para analisar um total de 16 genes, conforme mencionado acima, tendo colocado um gene endógeno por placa, sendo estes o *Gapdh*, *β -Actina* e da proteína ribossomal S18 ou RPS18.

Figura 7. Placa especial de 96 poços para *PCR* e esquema da montagem experimental para a análise de expressão gênica (*RT-qPCR*).



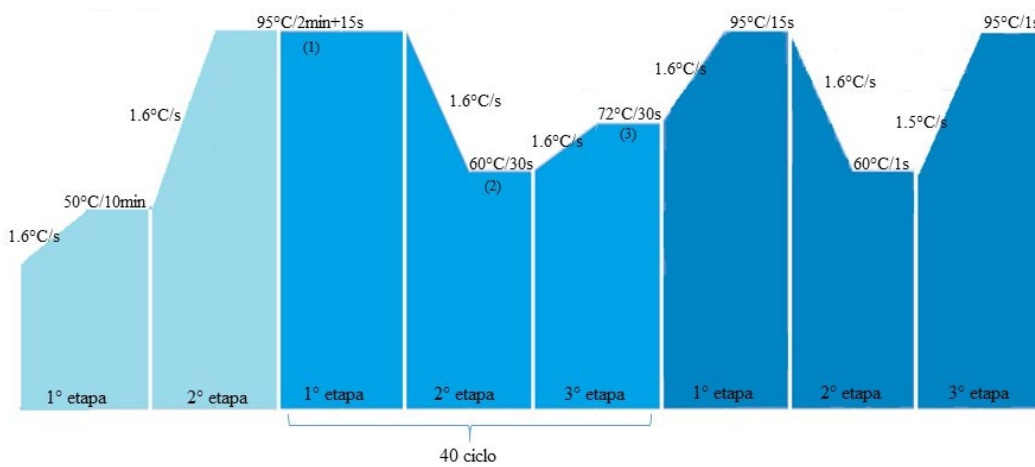
Os iniciadores específicos (*primers*) são oligonucleotídeos que se acoplam a uma parte específica de um gene específico por ter uma seqüência complementar. Um par de *primers* (paralelo e antiparalelo ou, *forward* e *reverse*) foi previamente estudado e elaborado para cada gene, conforme descritos na Tabela 3, e encomendados para a síntese (EXXTEND, Campinas-SP). As seqüências foram escolhidas para prover especificidade ao gene de cada proteína bem como, de maneira que a quantidade de intercalantes à associar fosse a mesma para qualquer cDNA. Neste trabalho, foram analisados 16 genes, cujos detalhes estão na Tabela 2, sendo 13 das proteínas de interesse e 3 restantes, de proteínas endógenas: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), β -ACTINA e proteína ribossomal S18 ou RPS18, que foram analisados simultaneamente para servirem de referência interna. Estes são conhecidas como genes de manutenção (*housekeeping genes*), são tipicamente constitutivos e são necessários para a manutenção da função celular básica, ou seja, são expressos por quaisquer células sob condições normais ou não, servindo para corrigir (normalizar) as diferenças produzidas desde a cultura celular, passando pela extração, até na análise por *qPCR*.

Tabela 3. Sequência do pares de primers e detalhes técnicos para ensaios de *RT-qPCR* em função dos genes.

Gene (ID)	Primer	5'- 3' Sequência	Condição de reação (desnaturação; anelamento; extensão)
<i>Gapdh</i> (14433)	<i>Forward</i>	AGG CCG GTG CTG AGT ATG TC	95°C – 8s; 58°C – 8s; 72°C – 8s
	<i>Reverse</i>	TGC CTG CTT CAC CAC CTT CT	
<i>Vegf</i> (22339)	<i>Forward</i>	TGACTCTCAGACCCCTGGAAT	95°C – 8s; 59°C – 8s; 72°C – 8s
	<i>Reverse</i>	GAGGGCACTGGGCTTTCTTA	
<i>Runx2</i> (12393)	<i>Forward</i>	GGA CGA GGC AAG AGT TTC A	95°C – 8s; 59°C – 8s; 72°C – 8s
	<i>Reverse</i>	TGG TGC AGA GTT CAG GGA G	
<i>Fak</i> (14083)	<i>Forward</i>	GGGACTCTGGAGGGTCTGAT	95°C - 15s; 63°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	ACGGCTTGACACCCTCATTG	
<i>Cofilina</i> (12631)	<i>Forward</i>	CAG ACA AGG ACT GCC GCT AT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	TTG CTC TTG AGG GGT GCA TT	
<i>Integrina-α 1</i> (109700)	<i>Forward</i>	TAT CCT CCT GAG CGC CTT T	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	TGG CCT TTT GAA GAA TCC AA	
<i>Integrina-β 1</i> (16412)	<i>Forward</i>	CTG ATT GGC TGG AGG AAT GT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	GTA GCA ATT GAA GGA TAA TCA TAG	
<i>Colágeno 3A1</i> (12825)	<i>Forward</i>	GAGGAATGGGTGGCTATCCG	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	TTGCGTCCATCAAAGCCTCT	
<i>Mmp2</i> (17390)	<i>Forward</i>	AAC TTT GAG AAG GAT GGC AAG T	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	TGC CAC CCA TGG TAA ACA A	
<i>Mmp9</i> (17395)	<i>Forward</i>	TGT GCC CTG GAA CTC ACA CGA C	95°C - 15s; 61°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	ACG TCG TCC ACC TGG TTC ACC T	
<i>Timp 1</i> (21857)	<i>Forward</i>	ATC CTC TTG TTG CTA TCA CTG	95°C - 15s; 61°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	GGT CTC GTT GAT TTC TGG G	
<i>Timp 2</i> (21858)	<i>Forward</i>	GCA ACA GGC GTT TTG CAA TG	95°C - 15s; 61°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	CGG AAT CCA CCT CCT TCT CG	
<i>Bsp</i> (15891)	<i>Forward</i>	GTA CCG GCC ACG CTA CTT TCT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	GTT GAC CGC CAG CTC GTT TT	
<i>OTC</i> (10090)	<i>Forward</i>	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	<i>Reverse</i>	GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	

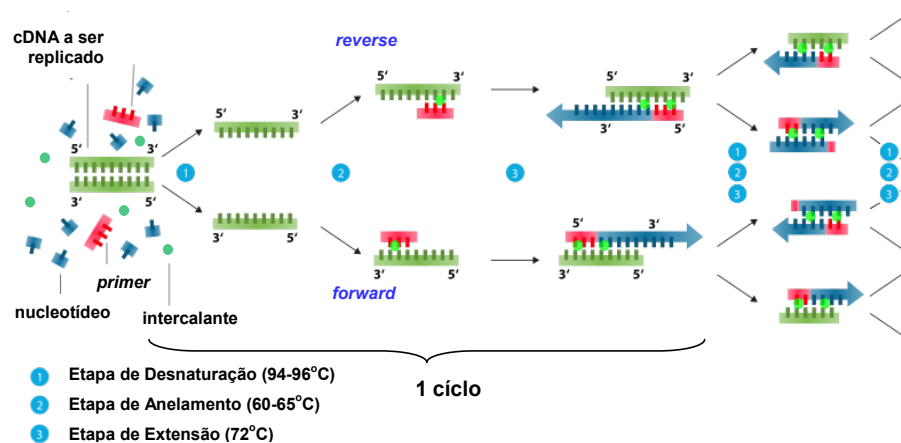
Após colocar todos os reagentes mencionados, as placas foram então submetidas aos 40 ciclos de Reação em Cadeia, conforme mostrado no esquema abaixo (Figura 8), num equipamento da Thermo Fischer, QuantStudio 3.

Figura 8. Ciclos de temperaturas, e respectivos tempos, aos quais os cDNAs foram submetidas para a análise por *RT-qPCR*.



A Figura 9 mostra os processos que ocorrem em cada ciclo, sendo que: à 95°C ocorre a desnaturação (separação) das cadeias de cDNA em duas cadeias simples; em 60°C, ocorre o anelamento (TM, do inglês *temperature of melting*), que se refere à ligação dos *primers* (iniciadores específicos) e intercalantes (SYBR® Green) nas cadeias desnaturadas e à 72°C, ocorre a síntese da cadeia complementar no sentido 5'→3' em extensão à cadeia dos *primers* (etapa de extensão ou alongação). Os intercalantes são corantes que absorvem a radiação azul ($\lambda_{\max}=497$ nm) e emitem no verde ($\lambda_{\max}=520$ nm) quando intercalados entre as cadeias complementares.

Figura 9. Esquema dos processos que ocorrem num ciclo de uma análise de expressão gênica por *RT-qPCR*.



Adaptado do BioRad (2023)

Conforme mencionado, o ciclo é repetido 40 vezes sendo que: (i) em uma condição ideal, a população do cDNA de um gene específico dobra (fator de ampliação) a cada ciclo; (ii)

o equipamento lê a fluorescência de todos os poços continuamente e haverá um ciclo em que a fluorescência de um determinado poço atinge a intensidade limiar de detecção, conhecida por ciclo limiar (C_t , do inglês *cycle threshold*); (iii) o C_t é diferente para cada poço, mas é tanto menor quanto maior a quantidade inicial do cDNA de uma proteína naquele poço; (iv) no C_t , o nível da unidade relativa de fluorescência (RFU) atinge a intensidade limiar de detecção (RFU_{C_t}) e é a mesma para todos os poços, assim como a quantidade total de cDNAs (Q_{C_t}), que é a quantidade inicial desse cDNA (Q_0) somada à das suas cópias, também igual.

Para o cDNA de uma dada proteína alvo, obtido do extrato de células cultivadas com o meio condicionado com um material tem-se que:

$$RFU = \varepsilon Q = \varepsilon Q_0 \cdot 2^C$$

onde RFU e Q são a unidade relativa de fluorescência e quantidade total de cDNA da proteína alvo, respectivamente, ambos no ciclo C, ε é a fluorescência molar e Q_0 é a quantidade inicial do cDNA, ou seja, no $C=0$.

Se a proteína alvo fosse por exemplo a Integrina- $\alpha 1$, obtida do extrato de células cultivadas com o meio condicionado com a amostra A, teria-se que:

$$RFU_{Int\alpha A C} = \varepsilon Q_{Int\alpha A C} = \varepsilon Q_{0 Int\alpha A} \cdot 2^C$$

para ciclo C qualquer. No ciclo limiar (C_t) do extrato desse cultivo tem-se então que:

$$RFU_{C_t} = RFU_{C_t Int\alpha A} = \varepsilon Q_{C_t} = \varepsilon Q_{Int\alpha A C_t Int\alpha A} = \varepsilon Q_{0 Int\alpha A} \cdot 2^{C_t Int\alpha A} \quad (8)$$

onde RFU_{C_t} e $RFU_{C_t Int\alpha A}$ é unidade relativa de fluorescência no C_t , Q_{C_t} é a quantidade total do cDNA no C_t e $Q_{0 Int\alpha A}$ é a quantidade inicial do cDNA, todos relativos à Integrina- $\alpha 1$ obtida do extrato de células cultivadas com o meio condicionado com a amostra A.

Para o cDNA da mesma proteína no grupo controle tem-se que:

$$RFU_{C_t} = \varepsilon Q_{C_t} = \varepsilon Q_{0 Int\alpha ctrl} \cdot 2^{C_t Int\alpha ctrl} \quad (9)$$

onde $Q_{0 Int\alpha ctrl}$ é quantidade inicial de cDNA da Integrina- $\alpha 1$ na amostra controle e $C_t Int\alpha ctrl$ é o ciclo em que a fluorescência atingiu nível limiar. Dividindo a equação (8) por (9) tem-se que,

$$1 = \frac{Q_{0 Int\alpha A} \cdot 2^{C_t Int\alpha A}}{Q_{0 Int\alpha ctrl} \cdot 2^{C_t Int\alpha ctrl}} \quad (10)$$

Re-escrevendo, tem-se que:

$$\frac{Q_{0 Int\alpha A}}{Q_{0 Int\alpha ctrl}} = \frac{2^{C_t Int\alpha ctrl}}{2^{C_t Int\alpha A}} = \frac{1}{2^{C_t Int\alpha A}} \quad (11)$$

A equação (11) indica que a quantidade inicial de cDNA, ou seja, a quantidade de gene transcrito em mRNA, é proporcional à $1/2^{C_t^{Int\alpha}}$. Rearranjando a equação (11), tem-se ainda que:

$$\frac{Q_0^{Int\alpha A}}{Q_0^{Int\alpha ctrl}} = \frac{2^{C_t^{Int\alpha ctrl}}}{2^{C_t^{Int\alpha A}}} = 2^{(C_t^{Int\alpha ctrl} - C_t^{Int\alpha A})} = 2^{-\Delta C_t^{Int\alpha A}} \quad (12)$$

sendo que $\Delta C_t^{Int\alpha A} = C_t^{Int\alpha A} - C_t^{Int\alpha ctrl}$. A normalização com o grupo controle é feita na forma de quantidade relativa inicial, proporcional à $2^{-\Delta C_t^{Int\alpha A}}$.

Entretanto, as diferenças experimentais na quantidade de células colocadas em cultura, variação das condições introduzidas durante a cultura (troca de meios etc), diferenças produzidas na extração de RNA como na centrifugação, pipetagem, variações durante a transcrição reversa etc, que não as inerentes às influências das modificações superficiais podem originar diferenças no $C_t^{Int\alpha A}$ e $C_t^{Int\alpha ctrl}$ de formas distintas. Assim, as Q_0 de todos os genes, incluindo todas as Q_0^{ctrl} , foram corrigidas primeiramente usando as Q_0 dos genes de referência (endógenos), que são aqueles que conhecidamente o nível de sua expressão não se altera com as modificações testadas, para então serem normalizadas pela do grupo controle. Neste caso, a quantidade inicial do cDNA de uma dada proteína é proporcional ao (fator de ampliação) $^{-\Delta\Delta C_t}$, conhecido como Método de Livak modificado. Os três genes endógenos (referência) utilizados foram os de: Gapdh, β -Actina e proteína ribossomal S18 ou Rps18, já mencionadas anteriormente, os quais foram submetidos às mesmas análises e seus dados foram utilizados para normalizar as quantidades iniciais de cDNAs antes de serem normalizadas pelos dos grupos controle.

Cabe esclarecer ainda que, nesse estudo, o fator de ampliação foi também determinado empiricamente considerando os genes de referência, seus *primers*, temperaturas e tempos. Assim, os resultados da expressão gênica foram expressos como média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes usando o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.3.6 Indução Osteogênica

Para induzir a diferenciação de osteoblastos, usamos uma metodologia clássica já bem descrita na literatura, onde tratou-se os pré-osteoblastos com meio contendo β -Glicerofosfato dissódico (10 mmol/L), Dexametasona (0,03 g/mL) e Ácido Ascórbico (50 μ g/mL), sendo todos os reagentes da Sigma-Aldrich. O grupo controle recebeu apenas o meio comum suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico.

a. Análise de diferenciação celular - Fosfatase Alcalina (Alp)

A diferenciação celular foi estimada pela atividade da enzima Fosfatase Alcalina (Alp), aqui avaliada pelo método de coloração. A fosfatase alcalina é uma enzima conhecida por regular a divisão e diferenciação celular. Além disso, ela também atua como uma proteína de sinalização que responde a estímulos externos, como estresse, inflamação e outros fatores.

A solução utilizada para a coloração foi preparada utilizando um *Kit* da Sigma-Aldrich (SIGMAFAST BCIP/NBT). Dissolveu-se inicialmente uma pastilha de 0,25g (reagente cromogênico) em 10 mL de água. Em seguida, à 2mL dessa solução foi acrescentado 0,5mL de tampão fosfato (PBS) 0,1mol/L, 0,5mL de Triton X-100, 0,5mL de guanidina em HCl 0,1mol/L e 1mL de Fosfato Ácido Dissódico (PAD, 0,5 mol/L). Esta solução foi usada para a reação com a fosfatase alcalina (Alp) para coloração.

Separadamente, o tampão para a lavagem foi preparada adicionando-se Tween 20 suficiente para 0,05% em PBS 10 mmol/L, livres de Ca^{2+} e Mg^{2+} .

As células foram plaqueadas e divididas em grupo controle (cultivado com meio constituído de DMEM + 10% de FBS + solução antibiótica), grupo com MO [meio constituído de DMEM + 10% de FBS + solução antibiótica, acrescido de indutores osteogênicos: β -glicerofosfato (10mmol/L), dexametasona (0,03 g/mL) e ácido ascórbico (50 μ g/mL)] e grupos supridos com o meio condicionado com os materiais (DMEM condicionado por 24h e suplementado com FBS à 10% e antibiótico à 1%). As células permaneceram em cultura por um período de 14 dias, sendo o meio renovado a cada 3 dias. Em seguida, foram cuidadosamente lavadas com o tampão para a lavagem e fixadas com formalina por 4 min. É importante atentar-se que a exposição prolongada à formalina inativa a fosfatase de maneira irreversível. Posteriormente, foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas por 15 min com a solução para coloração de Alp.

Após a incubação, a solução foi aspirada delicadamente, a monocamada celular foi lavada com o tampão de lavagem em volume suficiente, substituída pelo PBS e, por fim, a placa foi fotografada usando um microscópio invertido (Primovert da Zeiss, Alemanha). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

b. Análise de mineralização in vitro - vermelho de Alizarina

As células foram plaqueadas e mantidas em cultura exatamente como o procedimento detalhado acima. Após 14 dias, a mineralização *in vitro* foi avaliada pela capacidade de incorporação de cálcio à matriz sintetizada pelos osteoblastos através da marcação do cálcio

com o vermelho de Alizarina. O meio de cultura foi cuidadosamente removido e as células lavadas com PBS. Em seguida, o PBS foi aspirado e 0,5 mL de formalina 10%, adicionados para fixação das células. A placa foi mantida nessa solução por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a formalina foi sugada, a solução de Alizarina (1%) adicionada e a placa incubada no escuro por 45 minutos. Os poços foram então lavados com PBS por 5 vezes, após a última lavagem foram a eles adicionados 0,5 mL de PBS e analisados através de fotografia em um microscópio de ótica invertida (Primovert da Zeiss, Alemanha).

3.3.7 Zimografia

A zimografia é uma técnica que permite a detecção e quantificação de proteases (metaloproteínases de matriz, Mmps) em amostras biológicas pela análise da atividade enzimática dessas proteases. Esta técnica consiste da eletroforese em gel [poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), um agente desnaturante] e conta com a presença de gelatina em todo o gel. Como a gelatina é um substrato da enzima Mmps que a hidrolisa, permite a visualização das bandas correspondentes a sua atividade gelatinolítica. As Mmps são enzimas dependentes de Zn^{2+} e atuam na degradação do componente protéico da matriz extracelular e das membranas basais, ou seja, a sua atividade está relacionada à dinâmica da remodelação das células de pré-osteoblastos. As Mmps são secretadas na forma de proenzimas inativas, denominadas zimogenes, daí o nome da técnica de sua análise.

Inicialmente, o leito em gel foi preparado no tamanho de 8,0cm X 8,5cm X 0,15cm (altura x largura x espessura) sobre o molde em vidro utilizando os reagentes da Bio-rad (Hercules-CA, EUA) e gelatina da Sigma-Aldrich.

A porção superior (*upper gel*), de cerca de 2 cm de altura, é conhecida como gel de empacotamento ou empilhamento. É preparado de forma que tenha poros maiores para concentrar as proteínas das amostras em uma frente mais fina e assegurar que as proteínas cheguem na porção inferior (cerca de 6cm de altura), conhecida como gel de corrida ou de resolução, ao mesmo tempo. O gel de corrida normalmente é preparado antes do de empacotamento.

Neste trabalho, o gel de corrida foi preparado utilizando-se: poliacrilamida para 10%, dodecil sulfato sódico (SDS) para 0,1%, gelatina para 4%, persulfato de amônio (APS) para 0,05%, TEMED para 0,005%, tampão de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 0,355 mol/L em pH=8,8 e água (18,2MΩcm) (balanço). Os componentes foram adicionados na ordem e proporções indicadas, misturados e derramados no molde para preencher até uma altura de

6 cm. Em seguida, o gel de empacotamento foi preparado com os mesmos componentes com as mesmas quantidades, exceto a poliacrilamida, que foi adicionada para 4%, e o tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) que foi ajustado para o pH=6,8 ao invés de 8,8 e derramado no molde para preencher os 2 cm superiores. Transcorrido um tempo de 10 min para finalizar a polimerização, o leito foi montado em uma cuba vertical e o sistema foi preenchido com o tampão de TRIS, SDS e glicina, em pH=8,0, estando pronto para correr a eletroforese.

Após o meio de cultura condicionado com as amostras modificadas ou não e suplementado ter permanecido em cultura de células por um período de 72h (entre 144h e 216h, ou seja, entre 6º dia ao 9º dia), foi coletado e centrifugado a 14.000 rpm por 15 min permitindo a separação das células e detritos celulares da solução. Em seguida, foi realizado a dosagem de proteína no sobrenadante usando método adaptado de Lory (1951) (Kit RC DC™ Protein Assay BioRad).

Essas soluções, derivadas do contato indireto com as amostras, foram então misturadas com o tampão salino de fosfato (PBS, 0,5 mol/L) de pH=7,4 na proporção de solução/tampão 5:1 (definido com base no resultado da dosagem), e colocadas na parte superior do leito em gel deixando um espaçamento adequado entre elas com o auxílio de um gabarito. Uma mistura padrão de 10 proteínas recombinantes coloridas (marcadores) de massa molecular conhecida de 10 à 250kDa (*Precision Plus Protein Dual Color Standards #1610374*, da Bio-rad) foi também colocado na parte superior do leito e submetido à eletroforese ao mesmo tempo com as soluções amostras. A migração é determinada pela massa molecular, onde moléculas de massa menor migram mais rapidamente que as de maior massa e na comparação com as distâncias percorridas pelas proteínas do padrão de massas moleculares (PMs) conhecida estima-se as das ou identifica-se as Mmps. Um campo elétrico suficiente para uma corrente de 20 mA em 70 V (sendo que a extremidade inferior era o pólo positivo) foi aplicado, sendo que o sistema foi mantido a 10°C para evitar aquecimento.

Após a corrida de 6h de eletroforese, foi realizada a ativação enzimática. Para isso, desmontou-se a placa de vidro e o gel, colocado em uma solução de Triton X-100 à 2% e deixado em movimento constante por 40 minutos para a remoção do SDS, ou seja, para a renaturação das Mmps. Em seguida, o Triton foi descartado, tampão Tris.CaCl₂ pH=7,4 (Tris 50mM, CaCl₂ 10mM), adicionado e incubado na estufa a 37°C por aproximadamente 18 horas. Posteriormente, o tampão foi substituído por corante Coomassie Blue (G-250 da BioRad à 0,05%) e o gel mantido assim por 3 horas. A solução de corante foi então removida, substituída pela solução aquosa [de metanol (a 30%, v/v) e ácido acético glacial (a 10%, v/v)] em intervalos de 15, 30 e 60 min.

As bandas resultantes esbranquiçadas indicaram as atividades gelatinolíticas de Mmp-2 (~ 62 kDa) e Mmp-9 (~ 84 kDa). O gel “revelado” foi então fotografado, o contraste invertido para ser analisado usando o software Image J (Bethesda, MD) e determinada as atividades enzimáticas pela integração das manchas (LEFEBVRE; PEETERS-JORIS; VAES, 1991).

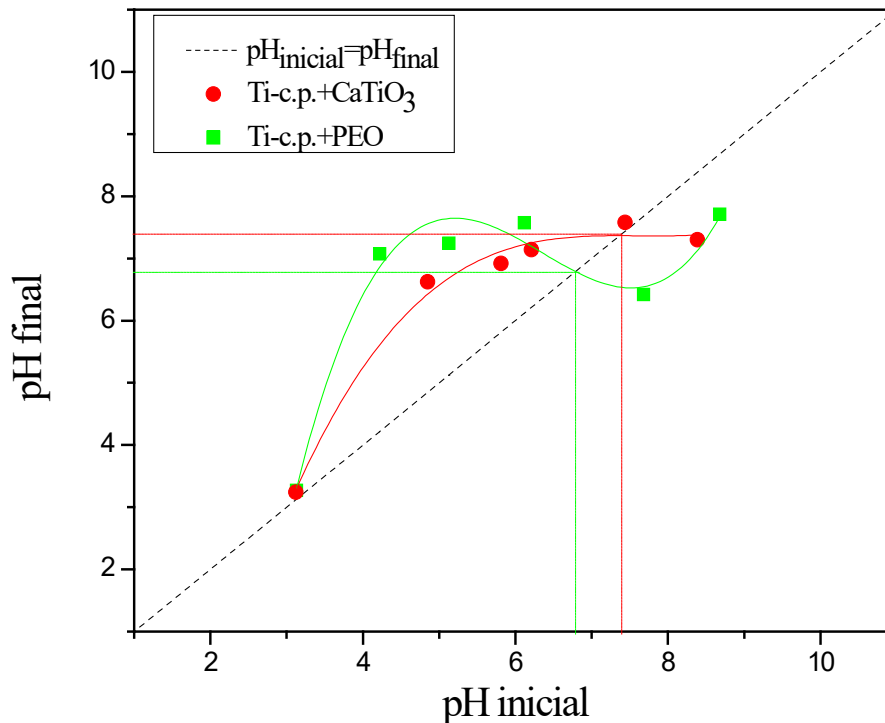
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do ponto de carga zero

Inicialmente, o ponto de carga zero das amostras de Ti-c.p. cujas superfícies foram modificadas por deposição de óxido de titânio (TiO_2) contendo titanato de cálcio (CaTiO_3) ou PEO foi determinado seguindo o procedimento descrito no item (3.2.1). Essa determinação teve por intuito escolher um sol de apatita estável em pH próximo ao PZC para favorecer a sua deposição sobre as superfícies acima. A Figura 10 mostra os resultados dessa análise. Os PZCs, que é o pH quando o $\text{pH}_{\text{inicial}} = \text{pH}_{\text{final}}$, foram 7,3 e 6,8 para Ti-c.p. modificados por deposição de óxido de titânio contendo titanato de cálcio pelo método sol-gel e PEO, respectivamente.

Com base nesse resultado, um método sol-gel descrito por NIU et al. (2016^a), onde o pH do sol utilizado é 6,0 (mais próximo possível dos PZCs encontrados) foi usado para a preparação de filmes de apatita. Não obstante, a concentração do sol utilizado no presente trabalho foi de 0,7 mol/L a fim de proporcionar filmes mais finos, enquanto o trabalho mencionado não menciona a concentração usada de forma clara.

Figura 10. Determinação do pH no ponto de carga zero (PZC) pelo método de deslocamento de pH em 24h, das amostras de: (a) Ti-c.p. modificado por deposição de titânia contendo cálcio e (b) Ti-c.p. modificado por PEO.

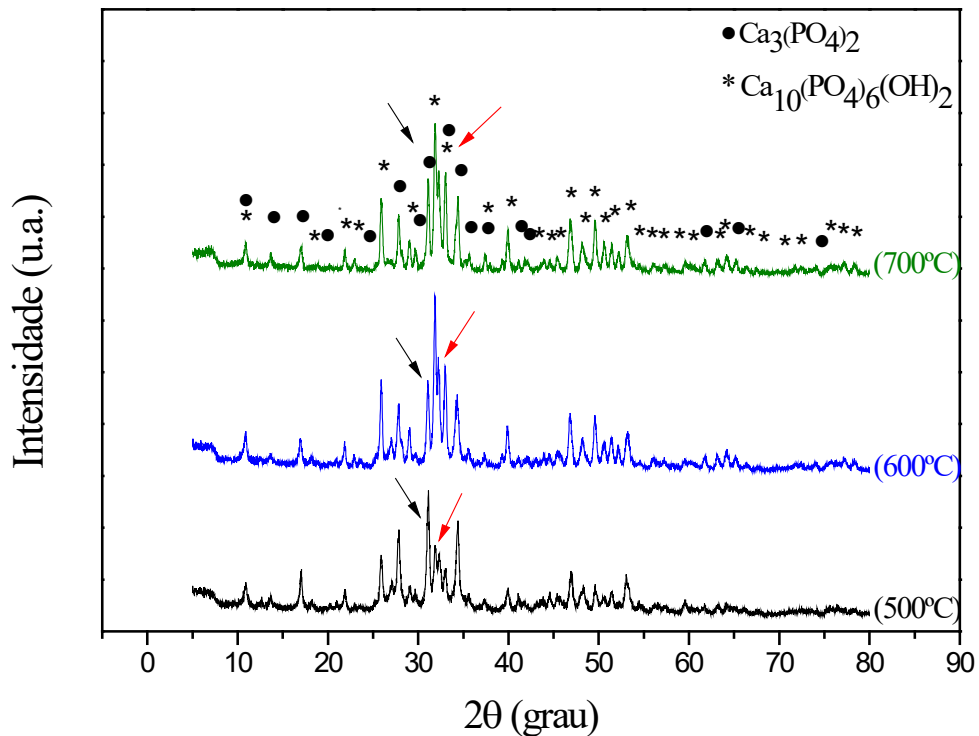


4.2 Otimização das condições para a preparação de apatita

Inicialmente, a apatita foi sintetizada na forma de pó seguindo-se o mesmo procedimento da obtenção em filmes, isto é, pelo processo sol-gel adaptado do proposto pelo Niu et al., descrito no item 3.1.6 da seção de materiais e métodos. Em seguida, foi secada à 80 °C por 48 h, pré-calcinado a 250 °C por 15 min e então calcinados em três temperaturas diferentes: 500 °C, 600 °C e 700 °C por 8 h, para determinar a temperatura que leva a um material com fase majoritária de hidroxiapatita. Os difratogramas dessas amostras estão apresentados na Figura 11.

Nota-se pela figura que as amostras são compostas de duas fases: hidroxiapatita, de fórmula unitária $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ com estrutura indexada como PDF 76-694, e β -TCP, de fórmula $Ca_3(PO_4)_2$ (PDF 70-2065), sendo que a quantidade da fase hidroxiapatita aumenta à medida que a temperatura de tratamento aumenta, principalmente de 500 °C para 600 °C. Como exemplo, destaca-se a intensidade do pico próximo a $2\theta=30^\circ$ atribuído a β -TCP (exibido pela seta de cor preta) que diminui e, em contrapartida, verifica-se que a intensidade do pico próximo a $2\theta=32^\circ$, demonstrado pela seta vermelha (referente à HAp), aumenta.

Figura 11. Padrão de difração de raio X (DRX) do pó de apatita, preparada por processo sol-gel, a partir de nitrato de cálcio e pentóxido de fósforo em etanol à 0,7 mol/L, gelatinização à 25 °C, secagem à 80 °C e tratamento térmico entre 500 °C e 700 °C por 8 h ao ar.



Os dados foram então submetidos ao refinamento das estruturas, usando o Método de Pawley (PAWLEY, 1981) e os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos por refinamento estrutural (Método de Pawley) dos padrões de difração das amostras de apatitas preparadas com o precursor à 0,7 mol/L e tratadas a 500 °C, 600 °C e 700 °C por 8 h.

Temperatura	500 °C		600 °C		700 °C	
Fase	HAp	TCP	HAp	TCP	HAp	TCP
a (Å)	9,403 (3)	10,465 (1)	9,404 (1)	10,456 (1)	9,413 (1)	10,450 (8)
b (Å)	18,905 (6)	10,465 (1)	18,878 (3)	10,456 (1)	18,868 (3)	10,450 (8)
c (Å)	6,889 (1)	37,435 (6)	6,887 (6)	37,409 (6)	6,888 (5)	37,410 (4)
L (nm)	33,0 (9)	23,0 (9)	43,6 (4)	25,3 (9)	38,0 (9)	48,4 (9)
Fase (%)	29,0 (5)	71,0 (5)	58,0 (5)	42,0 (5)	59,6 (4)	40,4 (4)

Os dados da Tabela 4 confirmam que a quantidade da fase HAp aumenta de 29% para aproximadamente 60% quando temperatura de calcinação aumenta de 500 °C para 700 °C, há alterações nos valores dos parâmetros de rede das fases em questão (discutidos mais adiante), bem como o tamanho dos cristalitos aumenta.

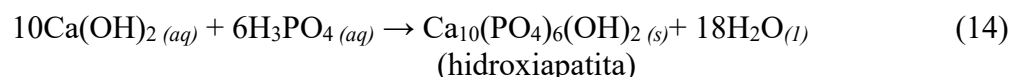
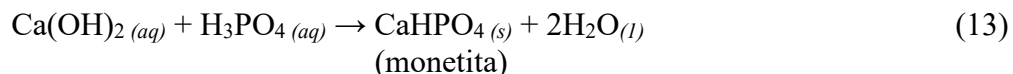
Obter a fase β -TCP em temperaturas tão baixas quanto 500 °C bem como ter um aumento na quantidade de hidroxiapatita com a elevação da temperatura contrariam a tendência encontrada nos trabalhos da literatura.

Cabe preannunciar que ao utilizar os precursores de tal modo que a razão Ca/P seja 1,0 favorece a formação de monetita (ver equação 7, adiante); se utilizar sob razão Ca/P=1,5, favorece a formação de β -TCP (ver fórmula na equação 11) e se Ca/P=1,67, favorece a formação de hidroxiapatita (ver equação 8).

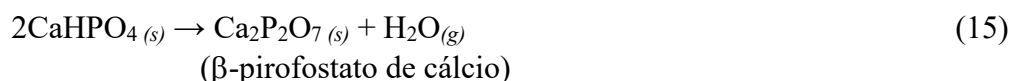
Nos estudos de Wang e colaboradores (1998), relataram que há um aumento na cristalinidade quando o pó de HAp preparado com a razão molar de Ca/P de 1,77 é calcinado a 900°C, entretanto, é acompanhado da perda de uma pequena quantidade de fósforo. Observaram também que o subsequente aumento na temperatura de calcinação provoca a decomposição térmica parcial da HAp em fosfato tricálcio (TCP) e/ou em fosfato tetracálcio [TTCP, $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$] (WANG; JU; CHERN LIN, 1998).

Liou et al. (2002) confirmaram a formação de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) (ICDD 9-432) quando prepararam via úmida pela reação de nitrato ou acetato de cálcio com fosfatos de amônio, sob a proporção de Ca/P=1,5, controlando-se o pH após a formação da mistura. Confirmaram que ao tratar em temperaturas acima de 700 °C obtêm o β -TCP (ICDD 9-169) devido à decomposição do CDHA. Notaram também que a fração do β -TCP depende do tempo e temperatura aos quais são submetidas e que a taxa de transição observada de HAp para β -TCP independe do precursor (reagentes de partida) usado (LIOU; CHEN, 2002).

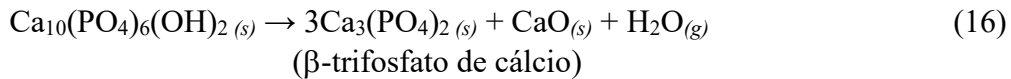
Para Othman e colaboradores (2017), o β -TCP não pode ser produzido diretamente da solução líquida: necessita passar pelo tratamento térmico para sua obtenção. Eles precipitaram o hidróxido de cálcio com o ácido fosfórico em quantidade suficiente para (q.s.p.) Ca/P=1,5 e trataram-na em temperaturas que compreendeu de 500 °C à 1300 °C. Mostraram que o pó seco, sem tratamento térmico, é composto de monetita e hidroxiapatita, devido às seguintes reações:



Mesmo que a razão Ca/P seja aquela que favorece a formação de β -TCP, forma-se inicialmente hidroxiapatita (Ca/P=1,67) e monetita (Ca/P=1,0). Em torno 500 °C o último decompõe formando o β -pirofosfato de cálcio segundo a reação:



Mostraram também que em temperaturas acima de 700°C, a HAp é decomposta em β -TCP e CaO (equação 16). Adicionalmente, ao atingir a temperatura de 900 °C tem-se a formação de uma única fase, de β -TCP, pois o CaO reage com pirofosfato de cálcio formando β -TCP conforme mostra a equação 11. Finalmente, concluíram que o β -TCP mantém-se estável até uma temperatura de 1300°C (OTHMAN et al., 2017).



Nilen e Richter (2007) prepararam a cerâmica bifásica de fosfato de cálcio (BCP), para usar como substituinte do osso, por reação no estado sólido da mistura mecanicamente obtida de β -TCP e HAp. Observaram que o conteúdo de β -TCP é fortemente influenciado pela temperatura de calcinação onde 850 °C é suficiente para promover a decomposição de HAp em β -TCP e que tal decomposição foi de 80% quando a temperatura de sinterização é de 1000 °C (NILEN; RICHTER, 2008).

O método sol-gel é uma rota de síntese também úmida e é geralmente empregado para preparar HAp na forma de filmes sobre um substrato. Nos trabalhos de Kim, Tang, Niu e respectivos colaboradores utilizaram $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e trietil fosfito ou P_2O_5 em etanol, sob proporção de Ca/P=1,67, cuja mistura foi dissolvida em álcool, depositada sobre o substrato de titânio e tratada termicamente à 400 °C ou 500 °C (KIM; KIM; KNOWLES, 2005) (TANG et al., 2018) (NIU et al., 2016b). Em todos os trabalhos citados acima, obtiveram filmes monofásicos de HAp, não notando nenhum pico referente à β -TCP nos difratogramas de raios X das amostras.

Nota-se que mesmo nos trabalhos em que a mistura precursora foi preparada sob Ca/P=1,5, condição esta que favoreceria a formação de β -TCP, forma tão somente HAp e monetita e a transformação para β -TCP ocorre somente se submetido aos tratamentos térmicos, geralmente acima de 700 °C.

No presente trabalho, a apatita foi preparada pelo método sol-gel em meio alcoólico sob razão nominal de Ca/P=1,67, condição favorável para a formação de HAp, entretanto, ao contrário do esperado, obteve-se amostras ricas em β -TCP em temperaturas tão baixa quanto 500 °C. Esses resultados demandam um estudo mais detalhado, que será sugerido como trabalho futuro, pois contrariam pesquisas (DOS SANTOS et al., 2005) que, empregando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico, a formação de β -TCP ocorre em temperaturas superiores a 700 °C, quando ocorre uma decomposição parcial da HAp e uma

perda de água e oxigênio. Contudo, outros fatores podem afetar a formação de β -TCP, como a presença de impurezas, a cristalinidade da HAp, o tamanho dos cristalitos, a taxa de aquecimento e tempo de tratamento térmico.

Portanto, é possível que a amostra de apatita com alta fração de β -TCP em temperaturas tão baixas quanto 500 °C fora produzido sob influência de alguns desses fatores. Esses fatores devem ter influenciado também na diminuição da fração da fase cristalina de β -TCP de 71% para 40% (aumento na quantidade da fase de HAp de 29% para 60%) com o aumento na temperatura de calcinação, de 500 °C para 700 °C. As alterações observadas nos valores dos parâmetros de rede das fases são, portanto, conseqüências da diminuição da fração de β -TCP de Ca/P menor (1,5) para formar amostras com maior fração da fase HAp (de Ca/P=1,67), o que deve ter ocorrido em detrimento da quantidade de cálcio formando fases deficientes nesse cátion, sendo a causa da redução do parâmetro de rede. A média da razão Ca/P das amostras, determinada por EDX, foi de 1,54, razão pela qual o CaO e outras fases ricas em cálcio não foram detectadas. Os resultados da análise composicional por EDX não serão mostrados no presente trabalho.

Todavia, os materiais sintéticos usados na substituição óssea (cerâmicas a base de fosfato de cálcio bifásico) são constituídos de hidroxiapatita (HAp) e β -TCP, onde a fase HAp é o componente cuja solubilidade em fluidos biológicos é baixa e a taxa de reabsorção é lenta, servindo portanto de arcabouço permanente, porém que exibem propriedades de osteocondução¹ e osteoindução² em casos especiais para a formação de osso e o β -TCP, que por ser o componente reabsorvível, satura o entorno com íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} e acelera o processo de formação de ossos (VALLET-REGÍ; GONZÁLEZ-CALBET, 2004) (DALLABRIDA et al., 2018).

Assim, estabeleceu-se que o Ti c.p. com e sem filmes modificadores contendo CaTiO_3 via sol-gel e PEO será tratado a 700 °C, após a deposição da solução precursora de apatita.

Não se estudou o comportamento em temperaturas acima de 700 °C, pois a formação de óxidos e mudança de fases de óxidos de titânio intensificam nessa faixa de temperatura bem

¹ Osteocondução é um conceito que denota o crescimento ósseo em uma superfície específica. Uma superfície osteocondutora é caracterizada pela sua capacidade de propiciar o crescimento ósseo em sua extensão ou em estruturas porosas, canais ou tubos associados (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

² Osteoindução é o fenômeno caracterizado pela capacidade intrínseca de estimular células primitivas, indiferenciadas e pluripotentes, induzindo-as a efetuar diferenciação na linhagem celular incumbida da osteogênese. Esta fenomenologia é meticolosamente delineada como um processo deliberadamente instigado com o propósito de iniciar a formação óssea (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

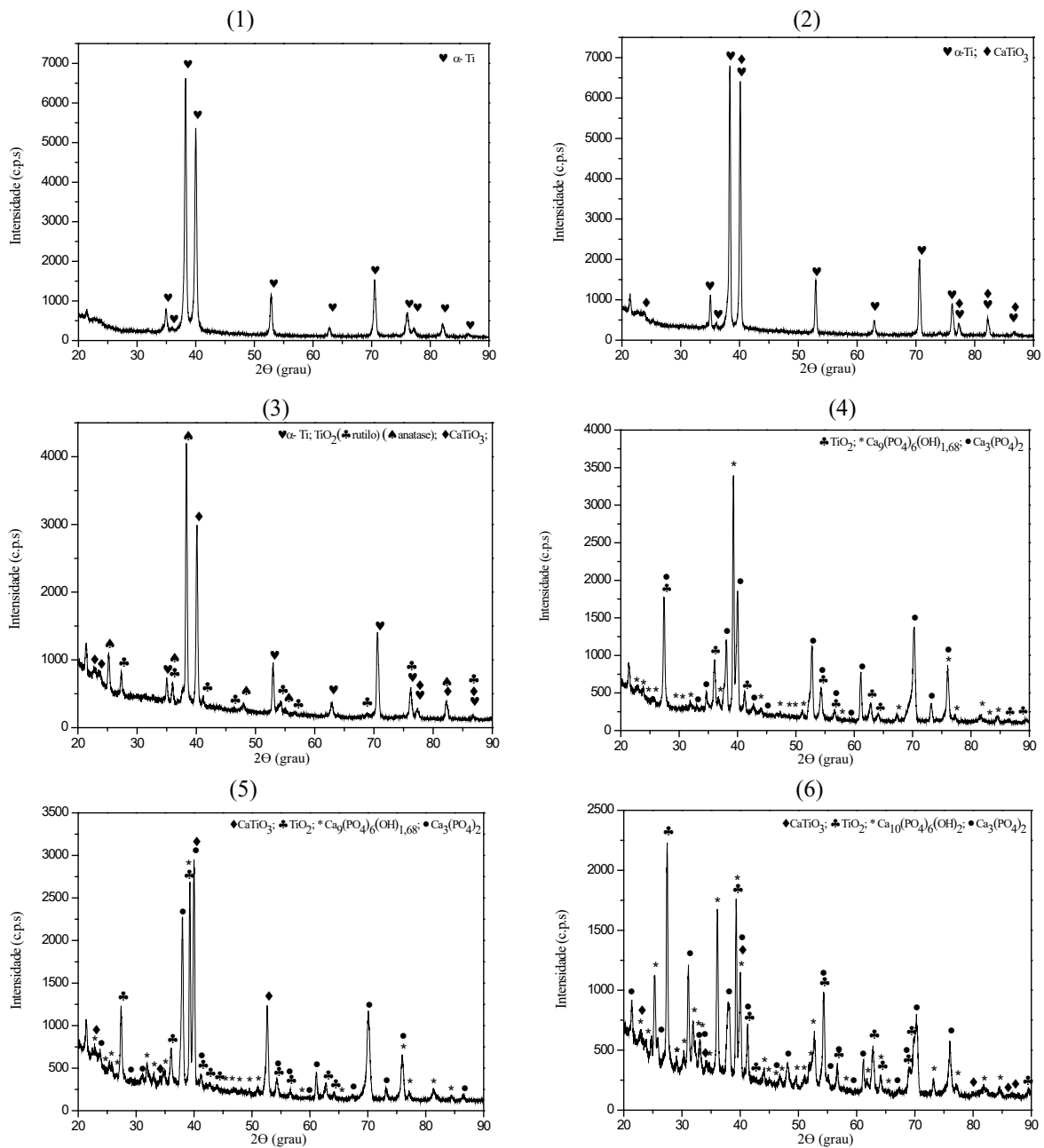
como, aumentam os riscos de transição de fases do próprio titânio. Adicionalmente, ainda se observava resíduos orgânicos e nitratos em temperaturas abaixo de 500 °C, razão pelo qual não se estudou a síntese abaixo dessa temperatura.

4.3 Difractometria de raios X (DRX) dos filmes modificadores de Ti-c.p.

A Figura 12 mostra os difratogramas de Ti-c.p. com ou sem filmes, obtidos sob configuração 2theta/theta (Método do Pó) com 8s/passos (ver 3.2.2). As fases foram comparadas com as do banco PDF-2 utilizando o programa Crystallographica SearchMatch. O difratograma do Ti-c.p. lixado, tratado por HCl e sem tratamento térmico [Figura 12(1)] ou com compostos, revelaram picos de difração do titânio alfa (α -Ti), de número PDF 89-2762 e estrutura hexagonal compacta.

Os difratogramas do Ti-c.p. com filmes modificadores, de óxido de titânio contendo titanato de cálcio [Figura 12(2)] por sol-gel e oxidada por plasma [Figura 12(3)], apesar dos picos serem de baixa intensidade e/ou sobrepostos que dificultam a identificação das fases presentes, pode-se constatar os picos de CaTiO_3 indexados sob número PDF 43-226 na amostra de Ti-c.p. com óxido e CaTiO_3 depositada via sol-gel [Figura 12(2)] e, no caso do Ti-c.p. modificado por PEO [Figura 12(3)], uma camada oxidada da mistura de TiO_2 anatase (PDF-71-1167) e rutilo (PDF-77-441) além dos picos de CaTiO_3 (PDF 43-226) foram detectados. Somam-se a tais picos os do α -Ti para ambas as amostras. No caso do Ti-c.p. com a camada com óxido contendo CaTiO_3 depositado via sol-gel, somente após a deposição de apatitas e tratamento à 700 °C [Figura 12(5)], foram detectados picos referente ao TiO_2 rutilo (PDF-77-441). As amostras de Ti-c.p. com o filme de apatita, apresentaram as duas fases de apatitas: a hidroxiapatita deficiente em cálcio, de fórmula $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$ e PDF 86-1203 e β -Trifosfato Tricálcico, de fórmula $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e PDF 70-2065, independente se continha ou não a camada intermediária de CaTiO_3 depositado via sol-gel. Picos de hidroxiapatita, de fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e PDF 82-1429, e β -Fosfato Tricálcico, foram identificados quando a apatita foi depositada sobre a camada oxidada via PEO [Figura 12(6)].

Figura 12. Padrão de difração de raios X (DRX) das amostras: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita. Medidas feitas sob modo 2theta/theta.



Holliday e Stanishevsky (2004) encontraram a fase CaTiO_3 cristalina depositada sobre Ti-c.p. via processo sol-gel somente quando tratou à 500°C . Esta é substancialmente inferior a 800°C , temperatura para cristalização de CaTiO_3 encontrada por Zhou e Akao (ZHOU; AKAO, 1997). Os resultados da literatura explicam porque os picos intensos de difração do CaTiO_3 não foram observados nos filmes obtidos por calcinação à 400°C . Indicam, por outro

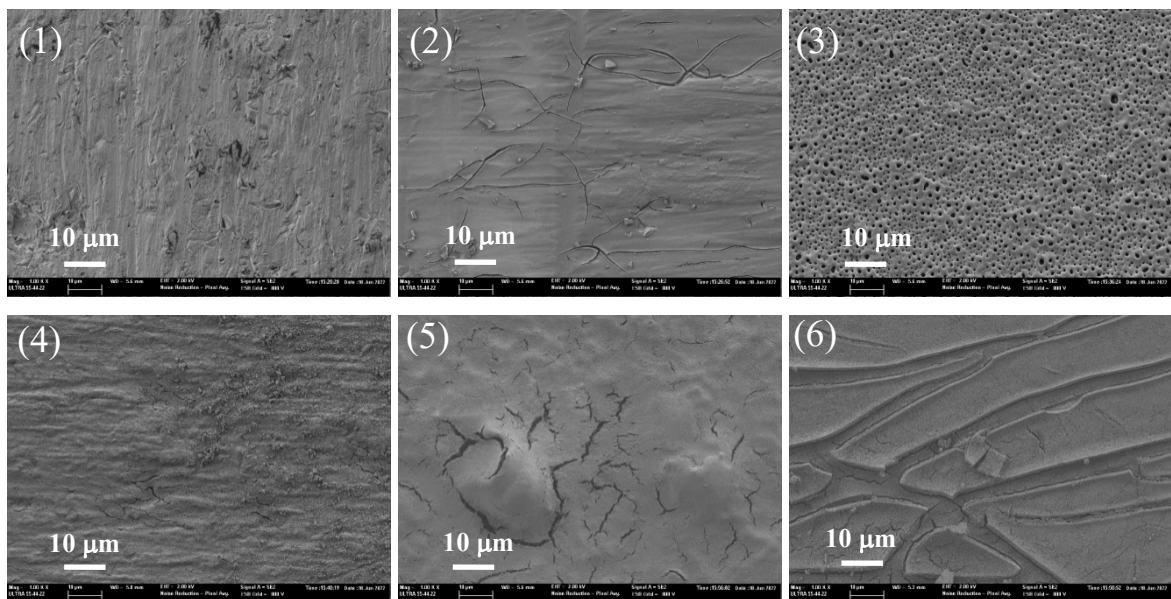
lado, que temperaturas acima de 400 °C podem ter sido alcançadas durante o processo de oxidação assistida por plasma eletrolítico.

Após a deposição da apatita e tratamento à 700 °C, houve também alterações na intensidade relativa dos picos referentes à α -Ti, como por exemplo, pico observados em $2\theta=38^\circ$ e 40° . A orientação preferencial poderia ser confirmada se o refinamento dos dados fosse possível para dados em filmes finos. Há sobreposição de picos de diversas fases, que dificulta a análise. Todavia, o tratamento químico com HCl e a deposição dos filmes modificadores associado ao tratamento térmico não mudaram substancialmente a estrutura cristalográfica do Ti-c.p. Os estudos de Cordeiro e Barão (2017) confirmaram que a fase α de Ti-c.p. permanece estável em temperatura de até 882 °C (CORDEIRO; BARÃO, 2017), o que corrobora com o acima afirmado.

4.4 Análise morfológica e composicional das superfícies modificadas de Ti-c.p. por MEV-EC e EC-EDX

A Figura 13 mostra as imagens da superfície de Ti-c.p. e Ti-c.p. com seus filmes modificadores na superfície.

Figura 13. Imagens obtidas por MEV-EC das superfícies das amostras de Ti-c.p. sem e com modificações: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO com apatita. Detector de elétrons secundários, com magnificação 1000x.



A Figura 13(1) mostra a superfície do titânio comercialmente puro (Ti-c.p.) após o polimento mecânico com sequência de lixas de 280, 400 e 1200 mesh e tratamento químico

(HCl). Nota-se que a superfície é rugosa com riscos feitos pelos grãos abrasivos das lixas. A análise da rugosidade será apresentada posteriormente (ver item 3.2.5).

Cita-se, na literatura, que o tratamento com o ácido da superfície antes e após lixamento feito por processo úmido, torna-se preparada para outros processamentos, no entanto pode produzir manchas na superfície devido a decapagem (CHO et al., 2008). Cabe ponderar que uma superfície com danos mecânicos maiores (maior porosidade e rugosidade) pode influenciar tanto no limite de resistência à tração, quanto na tensão de fratura do Ti-c.p. (CASALETTO et al., 2001), mostrando a importância da caracterização dessa propriedade antes e após as modificações. Por outro lado, a rugosidade pode constituir uma vantagem, provendo maior área de interfaces com o filme modificador e maior área superficial para o crescimento celular (melhor ancoragem das células).

Seguindo, as Figuras 13(2) à (6) mostram as imagens das superfícies das amostras de Ti-c.p. contendo filmes modificadores à base de óxido de titânio contendo cálcio via sol-gel e PEO, com filmes de apatita. De maneira geral, as observações são de que: (i) nas amostras de Ti-c.p. que contem filmes de óxido de titânio contendo cálcio via sol-gel, as rugosidades foram atenuadas com a deposição desse filme, entretanto, é provido de rachaduras, provavelmente devido à retração do filme durante a calcinação e diferença no coeficiente de dilatação térmica entre o filme e o substrato; (ii) a oxidação assistida por plasma eletrolítico (PEO) proporciona uma superfície porosa, com poros com distribuição e tamanhos regulares menores que $1\mu\text{m}$, em toda a superfície do Ti-c.p.; (iii) deposição direta de apatita sobre Ti-c.p. parece promover um filme mais fino, mas a rugosidade do substrato ainda é notada; (iv) a apatita depositada sobre o filme de óxido de titânio contendo cálcio via sol-gel, exibe uma boa cobertura, mas com rachaduras pela superfície, provavelmente devido à diferença no coeficiente de dilatação entre os filmes e substrato (LIU et al., 2002); (v) as rachaduras do filme intermediário (de óxido de titânio contendo cálcio) intensificou quando tratado em temperatura superior ($700\text{ }^\circ\text{C}$) devido à retração; (vi) a deposição de apatita sobre a camada oxidada via PEO promoveu a formação de uma camada mais espessa recobrando os poros, mas com rachaduras.

Embora pela difração de raios X não tenha revelado de forma clara todas as fases cristalinas nesses filmes, pode-se afirmar que o Ti-c.p. foi recoberto com o óxido de titânio contendo cálcio [Figura 13(2)] e que os precursores de apatita foram depositadas sobre Ti-c.p. contendo ou não a camada intermediária.

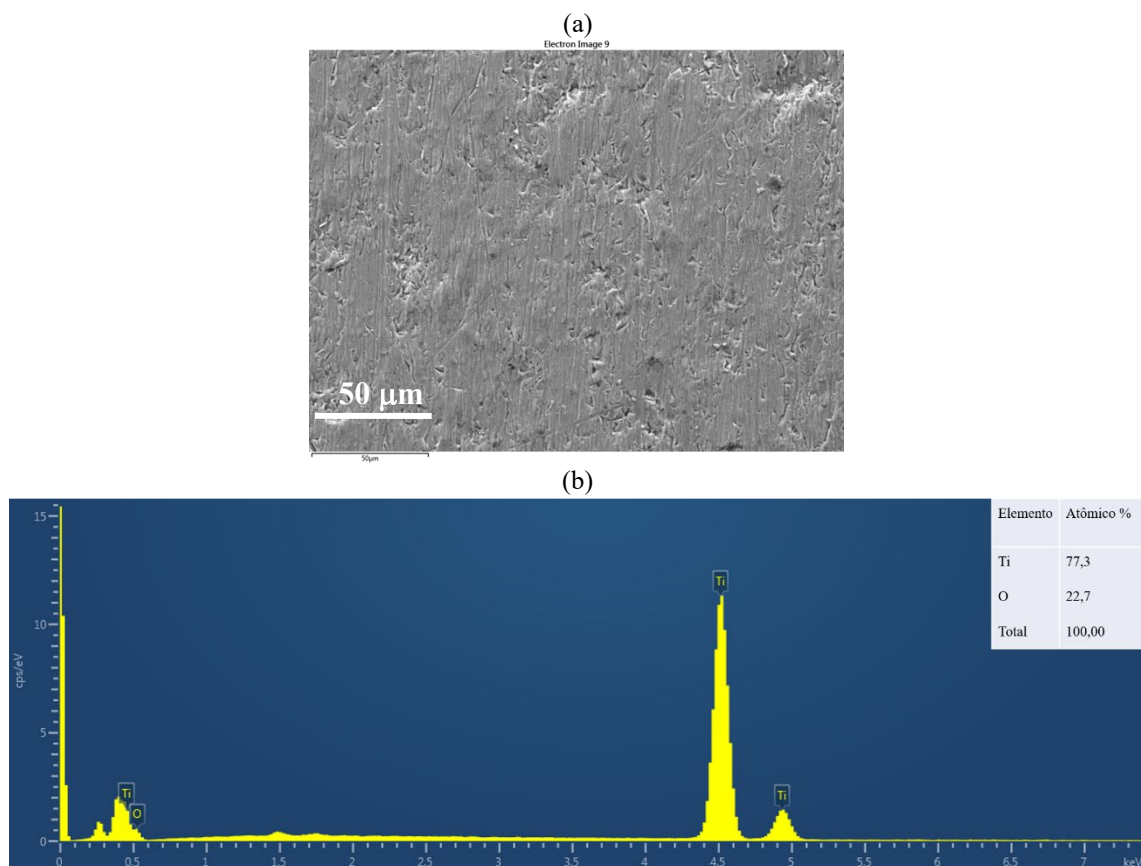
Fu e colaboradores (2011) citam que o banho ácido como pré-tratamento melhora a deposição direta de CaTiO_3 (FU et al., 2011), atribuindo à fina camada de óxido na superfície. No processamento por PEO, respeitando a condição que privilegia a formação de CaTiO_3

(SONG et al., 2004c), a camada passiva foi criada (ver próximo item) mas a síntese via sol-gel promove filmes de CaTiO_3 mais finas, devido a hidroxilação do titânio superficial e formação de camada de hidrogel. Portanto, picos de difração de baixa intensidade pode ser devido à amorficidade do CaTiO_3 depositado uma vez que foi tratado à $400\text{ }^\circ\text{C}$.

Em seguida, as mesmas amostras foram analisadas quanto à composição, usando um detector EDX acoplado a um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo.

A Figura 14 mostra a análise da superfície do titânio comercialmente puro (Ti-c.p.), em que após o polimento mecânico foi tratada quimicamente (HCl).

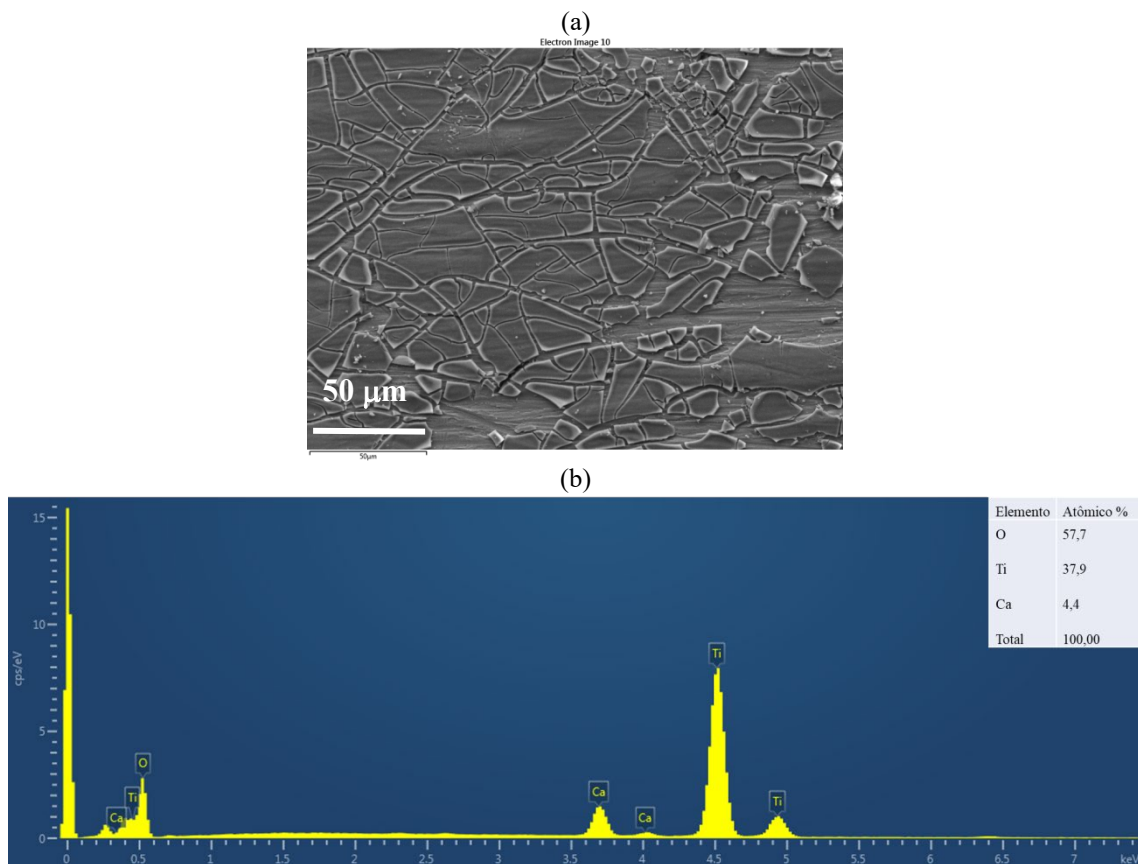
Figura 14. Análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p.: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem: 15KV.



A análise por EC-EDX revela claramente que Ti-c.p. tratado com HCl é composto de Ti e que, embora tenha a influência do oxigênio do ar, a superfície da amostra encontra-se oxidada devido ao teor significativo de oxigênio no resultado. Todavia, não foram encontradas espécies referentes aos resíduos de abrasivos ou de tratamento químico, indicando que o procedimento de limpeza pós-processamento foi eficiente.

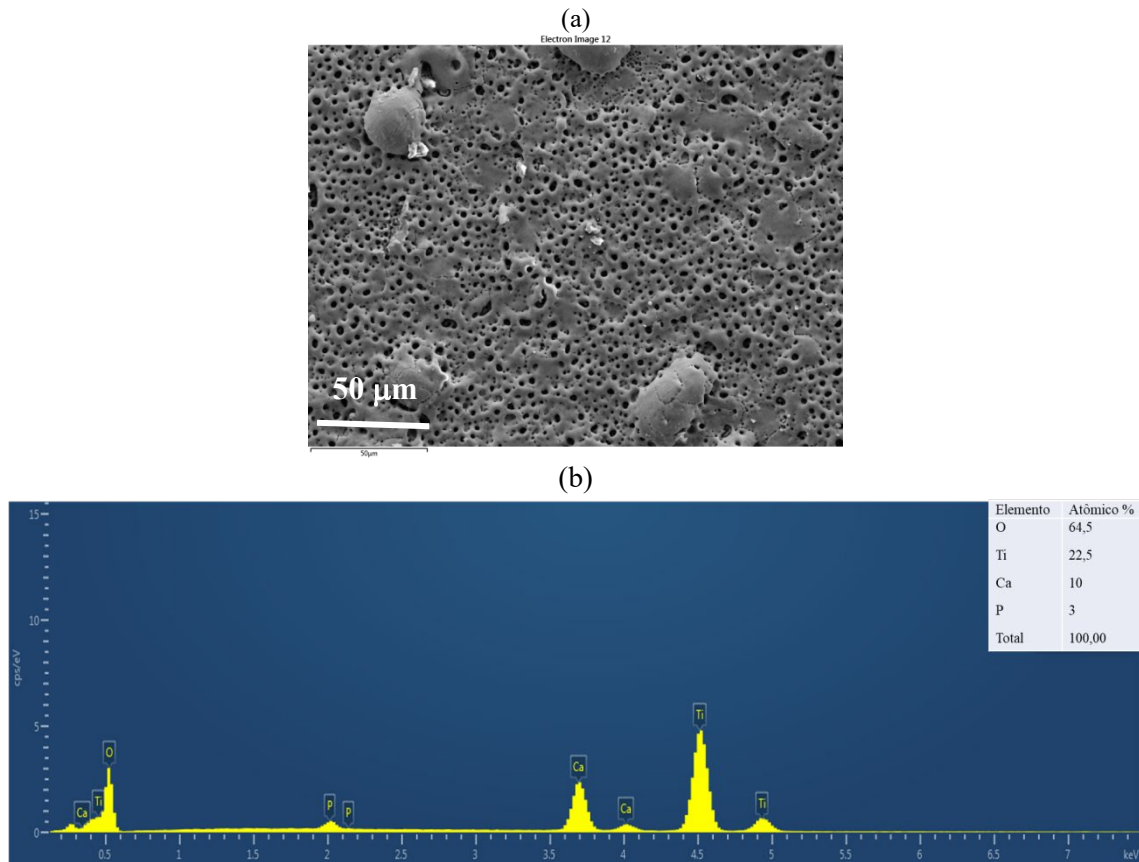
A Figura 15 demonstra a predominância de oxigênio e titânio na composição da amostra de Ti-c.p. contendo filme de titânia com cálcio e mostra claramente a presença de cálcio. Não é possível afirmar como essas espécies encontram-se combinadas e nem a quantidade depositada. Porém, o aparecimento dos picos referentes ao CaTiO_3 após tratar à $700\text{ }^\circ\text{C}$ na difratometria [Figura 13(2)], bem como a diferença morfológica na imagem por MEV-EC, combinada com o estudo feito por Holliday e Stanishevsky (2004), onde mostraram que a fase CaTiO_3 cristalina quando depositada sobre Ti-c.p via sol-gel é somente observada quando tratada à $500\text{ }^\circ\text{C}$, confirmam que CaTiO_3 amorfo deve estar presente na superfície do Ti-c.p..

Figura 15. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti- c.p com camada de titanato contendo cálcio: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.



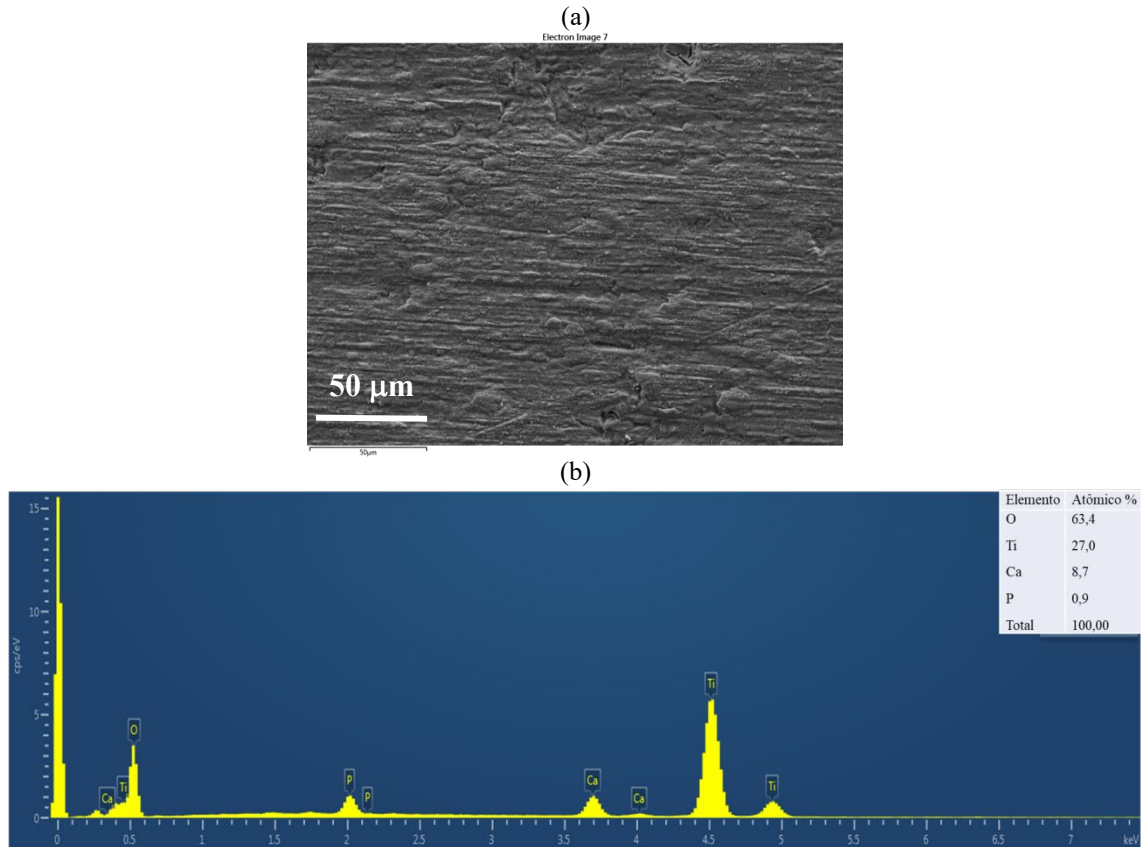
A Figura 16 mostra que o titânio, oxigênio, cálcio e fósforo estão presentes na amostra de Ti-c.p. com superfície modificada por PEO. Tais espécies são componentes do titânio metálico, óxido de titânio, titanato de cálcio e fosfatos de cálcio, fases confirmadas por DRX. Assim, o EC-EDX serviu para corroborar a presença das espécies que compõe as fases detectadas por DRX e que nenhuma outra espécie é encontrada na amostra.

Figura 16. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p. modificada por PEO: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem: 15KV.



A Figura 17 mostra que titânio, oxigênio, cálcio e fósforo estão presentes na amostra de Ti-c.p. contendo depósito de apatita que são componentes do titânio metálico, óxido de titânio e fosfatos de cálcio. A presença destas fases foi confirmada por DRX, assim, o EDX serviu para corroborar tais resultados, ou seja, a presença das espécies que compõe as fases detectadas. Nenhuma outra espécie foi encontrada na amostra.

Figura 17. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p com apatita: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.



Posteriormente, o Ti-c.p. contendo filmes de CaTiO_3 via sol-gel e PEO foi recoberto com filmes de apatita. As Figura 18 e 19 mostram as micrografias destas superfícies com os resultados da análise composicional. Nota-se a presença de titânio, oxigênio, cálcio e fósforo em ambas as amostras que são componentes do titânio metálico, óxido de titânio contendo cálcio e fosfatos de cálcio. A presença destas fases foi confirmada por DRX, assim, o EDX confirmou a presença das espécies que compõe as fases detectadas e que nenhuma outra espécie foi encontrada na amostra. A quantidade de cálcio em relação ao do titânio é nitidamente maior na amostra de Ti-c.p com CaTiO_3 e apatita que quando possuíam somente a camada intermediária, assim como as quantidades de cálcio e fósforo em relação ao do titânio são nitidamente maiores na amostra de Ti-c.p. tratada por PEO com filme de apatita que quando possuíam somente a camada gerada por PEO. Isso indica que os precursores das apatitas foram depositados sobre as camadas intermediárias. Somente, não é possível afirmar como essas espécies encontram-se combinadas e nem a quantidade depositada com base nos resultados de EDX, conforme já mencionado.

Figura 18. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p. com titanato de cálcio (via sol-gel) e apatita: (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.

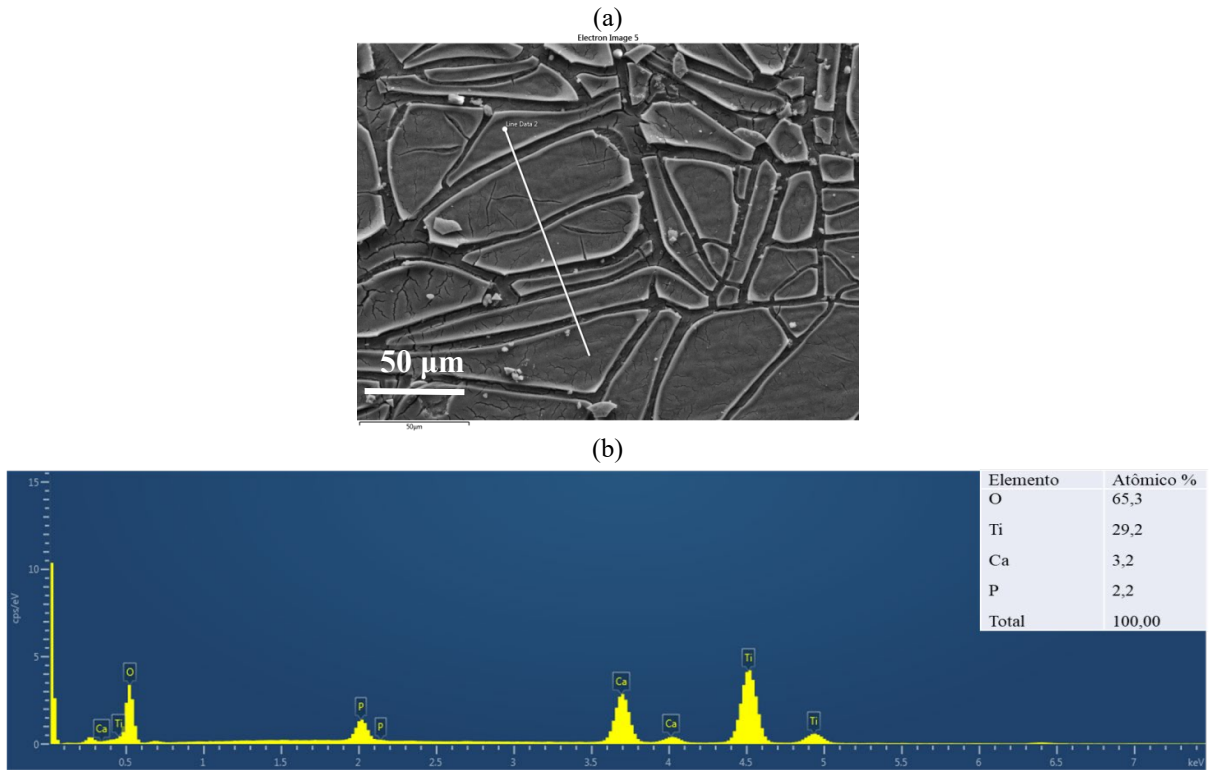
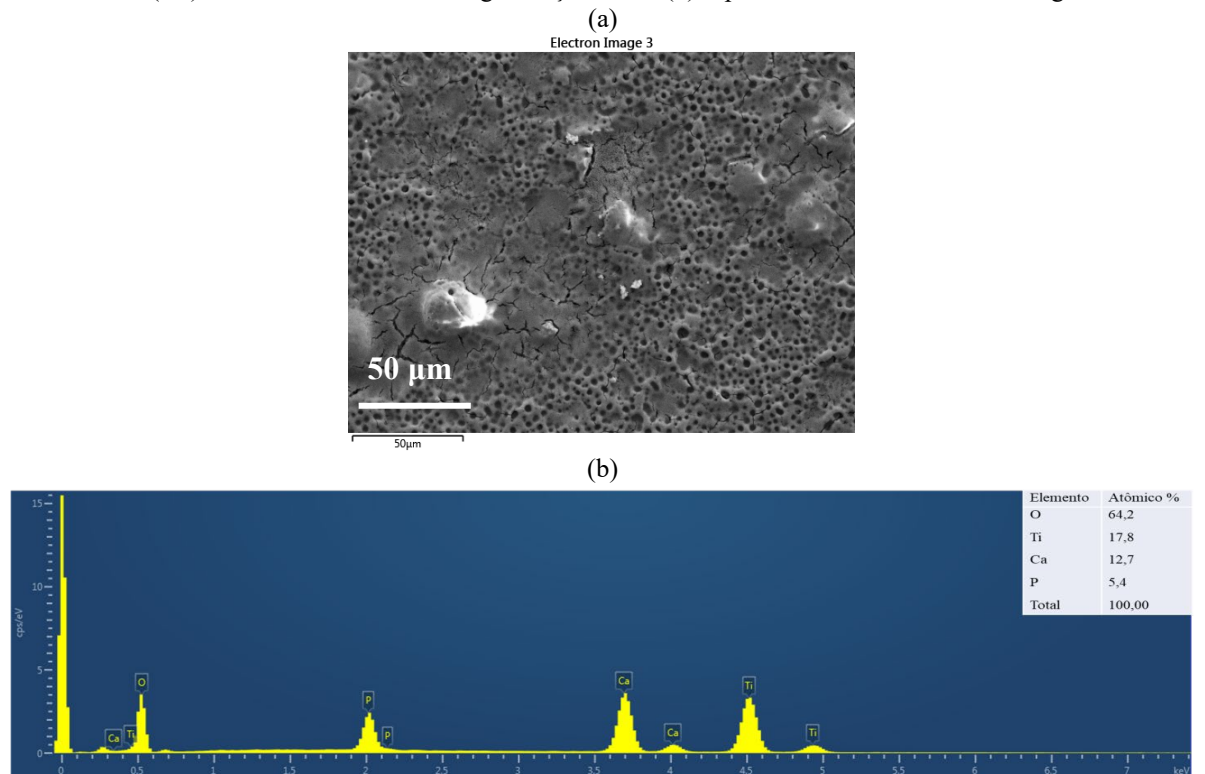


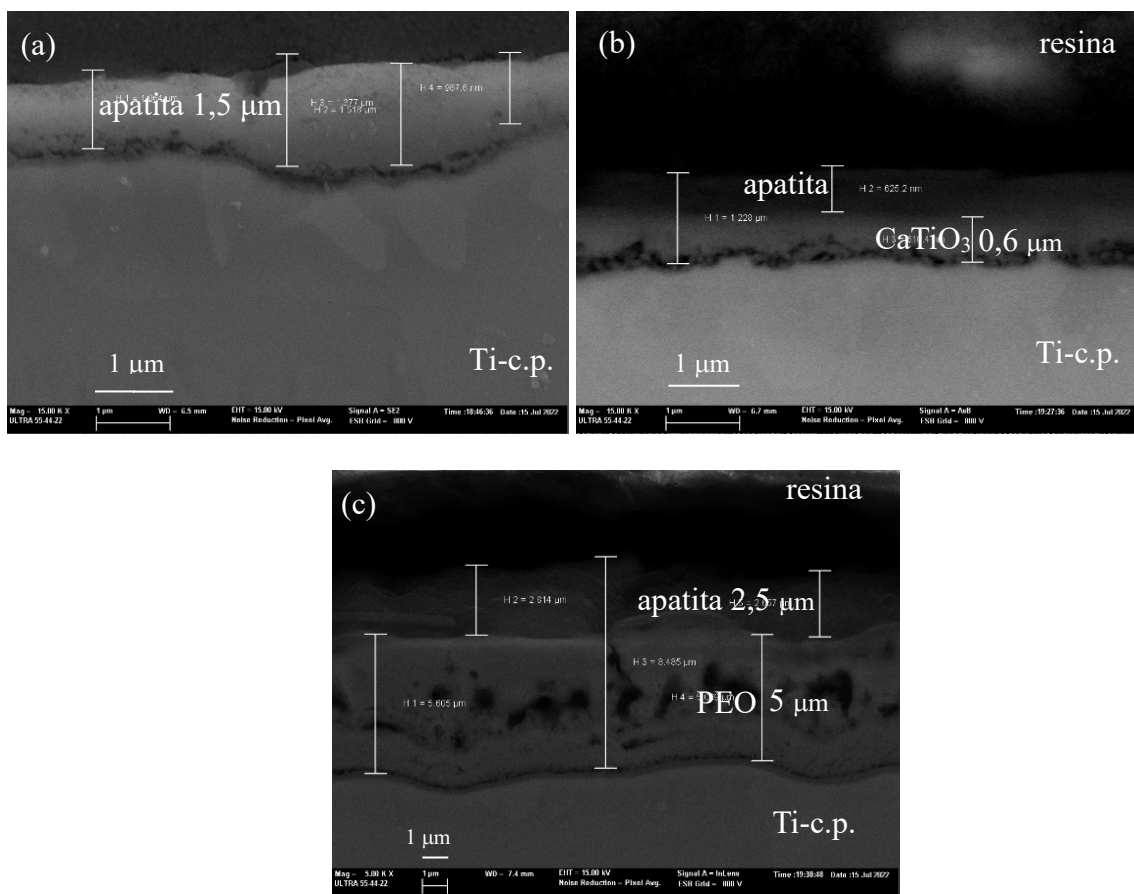
Figura 19. Imagens de MEV-EC acompanhadas por análise composicional semi-quantitativa por EC-EDX da superfície de Ti-c.p. modificada por PEO e recoberta por apatita (a) imagem construída por detector de elétrons secundário (SE) da área analisada com magnificação 500x. (b) espectro EC-EDX da área. Voltagem:15KV.



4.5 Determinação da espessura dos filmes modificadores

A Figura 20 traz uma imagem da seção transversal da amostra com filmes modificadores sobre o Ti-c.p. obtidas em um MEV-EC. Para estas análises, as amostras foram embutidas em uma resina, cortadas perpendicularmente à superfície com filmes, seguidas de lixamento, polimento e limpeza, conforme a descrição no item 3.2.4. A magnificação usada foi diferente para cada amostra, para ter melhor precisão na determinação da espessura.

Figura 20. Imagens de MEV-EC da seção transversal de Ti-c.p. com filmes modificadores: (a) Ti-c.p. com apatita; (b) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (c) Ti-c.p. com modificação superficial por PEO e apatita. Detector utilizado foi de elétrons secundários com magnificação 5000x (a e b) e 15000x (c).



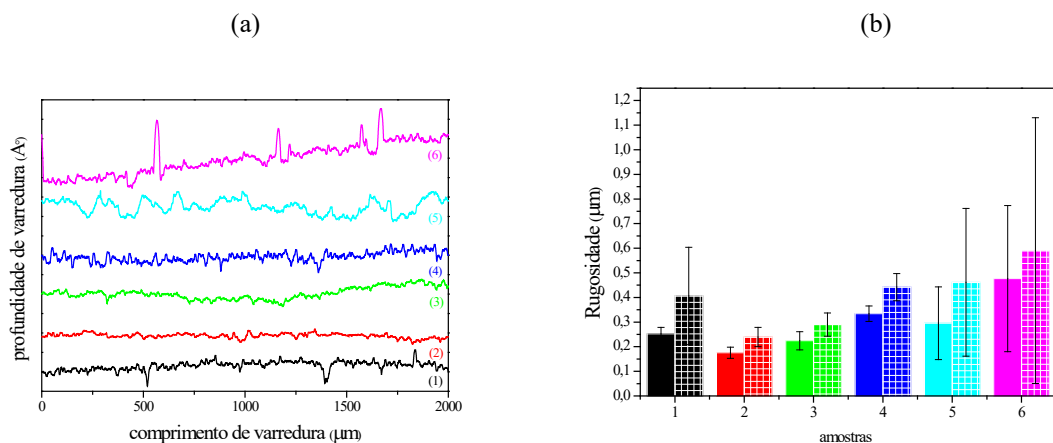
As micrografias das Figuras 20b e 20c mostram que o filme de CaTiO₃ obtido via sol-gel tem uma espessura de 0,6 μm e o modificado por PEO é poroso com cerca de 5 μm de espessura. Através da análise da Figura 20a, foi possível verificar que os filmes de apatita tem espessuras de 1,5 μm sobre Ti-c.p.. Quando é depositado sobre um filme intermediário de CaTiO₃ obtido via sol-gel e ou modificado por PEO, as espessuras são de aproximadamente 625 nm e 2,5 μm, respectivamente (Figura 20b e 20c). A condição química e morfológica da superfície deve ter influenciado na espessura do filme. O PZC do Ti-c.p. ainda não foi determinado no presente trabalho, mas a literatura fornece valores como $\text{pH}_{\text{PZC}}=4,6$ para titânio

(TAKAHASHI; FUKUZAKI, 2008) e $\text{pH}_{\text{PZC}}=6,0$, na presença de óxidos de titânio (BUSALMEN; DE SÁNCHEZ, 2001). Os da superfície recoberta com filme intermediário de CaTiO_3 via sol-gel e a modificada por PEO foram aqui determinados como sendo 7,3 e 6,8, respectivamente (ver item 4.1). Uma vez que o pH do sol precursor da HAp é 6,0 e que o filme depositado sobre a camada intermediária contendo CaTiO_3 (sol-gel) apresentou uma espessura menor, acredita-se que o sol de apatita seja constituído de partículas com carga negativa de baixa magnitude em pH 6,0. No caso do Ti-c.p. modificado por PEO, a porosidade foi também importante para a espessura de 2,5 μm da apatita.

4.6 Perfilometria de contato

O perfil de rugosidade das amostras de Ti-c.p. com e sem filmes modificadores, obtido em um perfilmetro mecânico, usado no modo de contato conforme o procedimento descrito no item 3.2.5, está na Figura 21. Nota-se que as distintas etapas do processo de modificação das superfícies aos quais as amostras foram submetidas influenciaram nos perfis de rugosidade.

Figura 21. Estudo da influência das modificações na rugosidade das amostras de Ti-c.p. sem e com modificações: (a) Perfis de rugosidade; (b) quantificação de rugosidade quanto à Ra (barra cheia) e Rq (barra quadriculada). Amostras: (1) Ti-c.p. (preto); (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio (vermelho); (3) Ti-c.p. modificado por PEO (verde); (4) Ti-c.p. com apatita (azul); (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita (azul claro) e (6) Ti-c.p. modificado por PEO com apatita (rosa).



A Figura 21a apresenta o perfil da rugosidade *versus* o comprimento de varredura da ponteira de diamante ao longo da superfície das amostras analisadas. Com base nesse perfil o *software* estabelece a linha média e calcula automaticamente os valores de rugosidade. Figura 21b ilustra um gráfico de barras com os valores da rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq), com desvio padrão de 10 medidas em cada superfície. O tratamento abrasivo (lixamento), feito na superfície de Ti-c.p., produziu rugosidades Ra próximo a $0,253 \pm 0,02 \mu\text{m}$ e Rq a $0,406 \pm 0,19 \mu\text{m}$. A modificação da superfície de Ti-c.p. por filmes de CaTiO_3 via sol-gel diminuiu os valores de rugosidade para Ra de $0,175 \pm 0,02 \mu\text{m}$ e Rq de $0,239 \pm 0,03$. Já a amostra

de Ti-c.p. modificado por PEO teve um aumento do valor da rugosidade, devido à camada porosa de óxido, apresentando valores de Ra de $0,224 \pm 0,03 \mu\text{m}$ e Rq de $0,290 \pm 0,04$. Entretanto ao depositar filmes de apatita sobre as camadas intermediárias, os valores de rugosidade Ra aumentaram. Para a amostra de Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita, os valores foram de Ra= $0,295 \pm 0,14 \mu\text{m}$ e Rq= $0,461 \pm 0,30$ e para Ti-c.p. modificado por PEO com apatita o Ra foi de $0,475 \pm 0,29 \mu\text{m}$ e Rq de $0,590 \pm 0,54$. Nota-se que a deposição de filme de apatita sem camada intermediária sobre Ti-c.p. produziu uma superfície com rugosidade Ra também alta, de $0,334 \pm 0,03 \mu\text{m}$ e Rq $0,442 \pm 0,05$. Para um mesmo segmento de uma superfície, a comparação entre os valores de Ra e Rq pode acrescentar informações mais refinada sobre as irregularidades entre picos e vale, observadas na Figura 21a. A diferença entre Ra e Rq foi semelhante para a maioria das amostras, sendo maior para as mostras que apresentaram rachaduras no filme (ver Figura 13).

A estes resultados, ZHU (2004) expõe em seus estudos que osteoblastos humanos aderem melhor a superfícies rugosas que lisas e a adesão é geralmente aumentada em superfícies com rugosidade média (Ra) em torno de $1 \mu\text{m}$ (ZHU et al., 2004), ou seja, não se deve esperar uma influência significativa da rugosidade nos ensaios biológicos.

4.7 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Nas imagens tridimensionais da Figura 22 obtidas por um AFM é possível observar que os distintos tratamentos de superfície de Ti-c.p. e recobrimentos feitos com filmes modificadores, bem como a temperatura ao qual foi submetida influenciaram diretamente na morfologia e topografia da superfície. A quantificação da rugosidade leva em consideração a distribuição de alturas na superfície da amostra e fornece tais informações em escala nanométrica, neste caso. Tons claros representam maiores elevações topográficas e, ao contrário, em tons mais escuros estão as regiões com maior profundidade.

Na imagem da Figura 22(1), de Ti-c.p. pré tratadas (lixamento e banho químico), pode-se notar picos e vales de magnitudes menores quando comparados aos de outras amostras, com estrias paralelas como se fossem sulcos formados provavelmente ao lixar. O gráfico em barras exhibe menores valores de rugosidades Ra e Rq, também em relação aos das amostras com filmes modificadores.

Figura 22. Imagens topográficas em 3D, obtidas por Microscopia de Força Atômica (AFM), de: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.

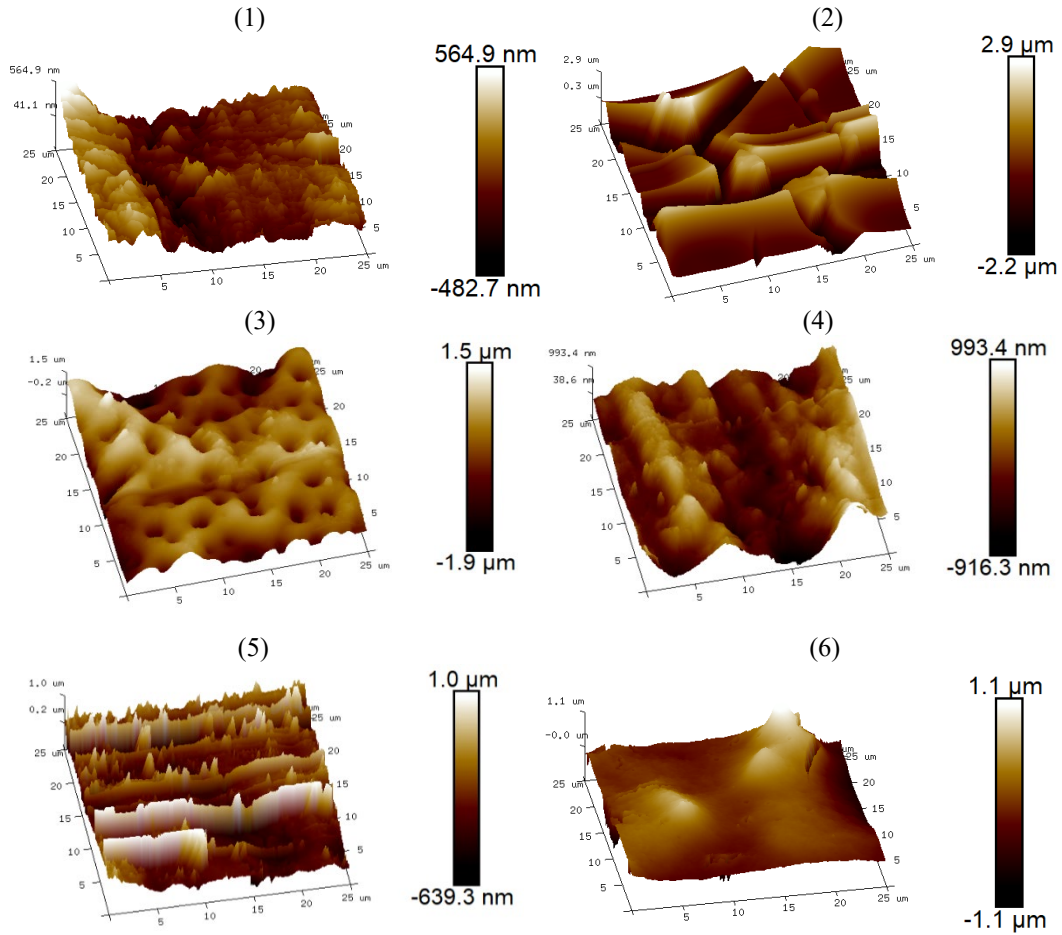
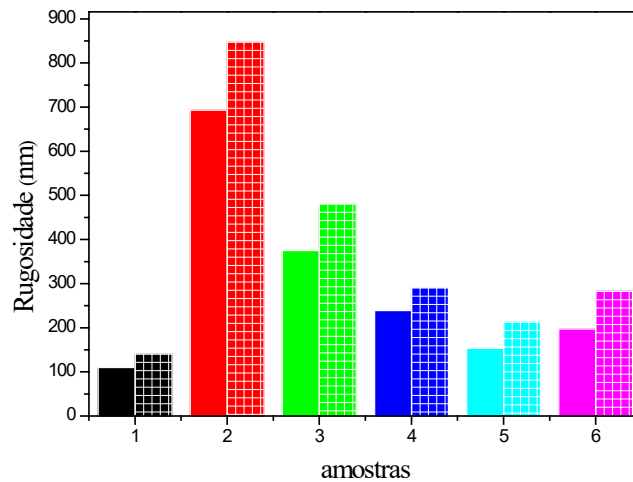


Figura 23. Quantificação de rugosidade quanto à Ra (barra cheia) e Rq (barra quadriculada) por Microscopia de Força Atômica (AFM) das amostras: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.



As imagens das Figuras 22(2) e (3) mostram que rugosidades são maiores para amostras com camadas intermediárias. A rugosidade maior da amostra de Ti-c.p. com titanato de cálcio [Figura 22(2)] se deve às rachaduras da camada de titanato de cálcio. A superfície porosa é característica da camada oxidada via PEO [Figura 22(3)], com poros circulares de formações vulcanoides de profundidades variadas de alguns micrômetros.

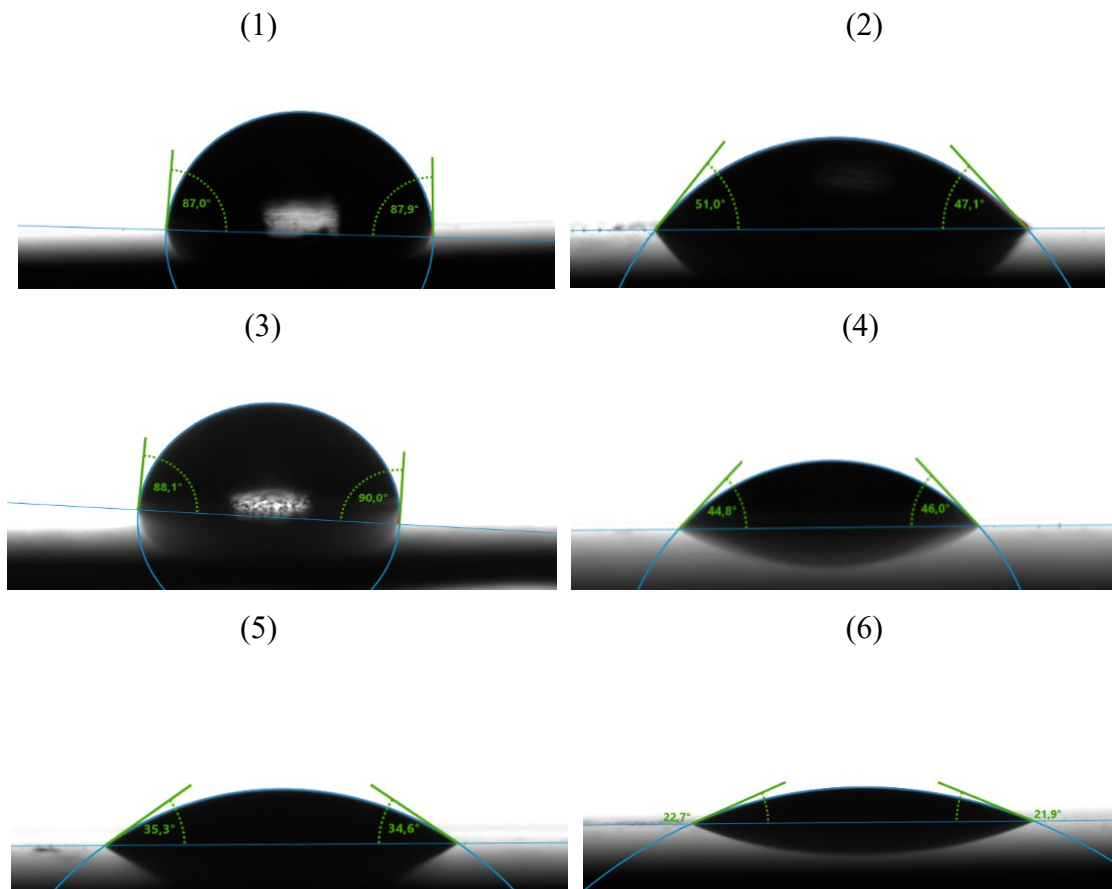
Depressões em forma de lacunas com picos arredondados é vista na imagem da Figura 22(4), da amostra de Ti-c.p. com apatita sem a camada intermediária. O padrão morfológico da superfície de Ti-c.p. com o filme de CaTiO_3 e apatita, imagem da Figura 22(5), é de ondulações pontiagudas com diferentes alturas de picos. As formações vulcanoides na superfície da Figura 22(6) foram recobertas pela deposição do filme da apatita sobre a camada oxidada por PEO indicando que o precursor de apatita preencheu os poros e promoveu diminuição nos valores dos parâmetros de rugosidades (visto na Figura 23).

Diferença nas rugosidades obtidas por perfilometria e AFM está no tamanho das sondas empregadas em cada método. No caso da perfilometria, foi empregada uma ponteira de diamante com um raio de $12,5 \mu\text{m}$, enquanto no AFM, utilizou-se uma ponta de silício com um raio ínfimo de 5 nm , representando uma diferença no tamanho entre as sondas de 2500 vezes. Além disso, as discrepâncias são evidentes no comprimento de varredura adotado em cada abordagem. Enquanto a perfilometria cobriu uma extensão de $2.000 \mu\text{m}$, o AFM operou em uma escala significativamente menor, com um comprimento de varredura de $25,0 \mu\text{m}$, sendo 80 vezes inferior. A Figura 21(a) destaca que a distância entre as variações notáveis no relevo foi de $500 \mu\text{m}$ na maioria das amostras, chegando a $50 \mu\text{m}$ na amostra (5). A observação das imagens revela que, devido ao comprimento de varredura restrito a $25,0 \mu\text{m}$ no AFM, a área analisada pode não abranger regiões com elevadas depressões ou picos. Por exemplo, a Figura 22 evidencia que as grandes variações no relevo, quando analisadas pelo AFM, ocorrem a cada $1 \mu\text{m}$ ou $5 \mu\text{m}$. Tais detalhes escapam à perfilometria, uma vez que o diâmetro da ponteira utilizada nesse método é de $25 \mu\text{m}$, incapaz de capturar essas variações diminutas. Essa discrepância dimensional entre as sondas e os comprimentos de varredura destaca a necessidade de compreender as características específicas de cada técnica para uma análise rigorosa da rugosidade da superfície.

4.8 Molhabilidade (ângulo de contato) e energia de superfície

Como estudo inicial, a Figura 24 ilustra algumas imagem das gotas de água destilada ($\sim 2\mu\text{L}$) aplicada na superfície de Ti-c.p com e sem filmes modificadores.

Figura 24. Ângulo de contato das gotas de água sobre superfície das amostras de: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO com apatita.



Os ângulos de contato (média e desvio padrão de 5 medidas/gota de 3 gotas) dos líquidos (água e diiodometano) com a superfície de Ti c.p., com e sem filmes modificadores, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Ângulo de contato da água e diiodometano com as amostras de Ti-c.p. com e sem modificações de superfícies.

Amostras	Ângulo de contato [°]	
	Água	Diiodometano
(1) Ti-c.p	89,43 ±6,80	45,83 ±1,30
(2) Ti-c.p+CaTiO ₃	50,70 ±1,67	38,09 ±3,45
(3) Ti-c.p+PEO	88,39 ±5,27	50,32 ±3,37
(4) Ti-c.p+apatita	44,92 ±5,48	46,48 ±2,88
(5) Ti-c.p+CaTiO ₃ + apatita	35,20 ±2,91	27,99 ±4,00
(6) Ti-c.p+PEO+ apatita	22,25 ±2,84	31,96 ±1,12

A Tabela 6 apresenta componentes dispersivos e polares da tensão superficial calculados com base nas equações 1 e 2, descrito no item (3.2.7), bem como os valores da energia de superfície (equação 3).

Tabela 6. Componentes dispersivos e polares da tensão superficial e energia de superfície dos sólidos calculados.

Amostras	(γ_s^D) Dispersiva [mN/m]	(γ_s^P) Polar [mN/m]	(γ_s) Energia de superfície [mN/m]
Ti-c.p	36,56 ±0,70	2,00 ±1,66	38,57 ±2,36
Ti-c.p+CaTiO ₃	40,56 ±1,68	18,52 ±1,17	59,08 ±2,86
Ti-c.p+PEO	34,10 ±1,88	2,65 ±1,51	36,75 ±3,39
Ti-c.p+ apatita	36,21 ±1,56	23,81 ±3,34	60,02 ±4,90
Ti-c.p+CaTiO ₃ + apatita	41,93 ±1,35	29,95 ±1,90	71,89 ±3,25
Ti-c.p+PEO+ apatita	43,39 ±0,49	31,55 ±1,07	74,94 ±1,56

Verifica-se que a média do ângulo de contato da água com a amostra de Ti-c.p. é $\sim 90^\circ$, ou seja, apresenta comportamento no limite do considerado hidrofílico e hidrofóbico (CUNHA et al., 2015). O desvio-padrão de cerca de 7,6 % pode ser uma consequência do pré tratamento do Ti-c.p., formando uma pequena camada de óxido de titânio não homogênea na superfície (SILVA, 2013) e irregularidades devido às lixas, conforme apresentadas nas micrografias da Figura13(1). Pequena redução no ângulo de contato pode ser vista como o resultado de duas contribuições: da diminuição do ângulo quando se oxida a superfície via PEO e do aumento, relacionado à porosidade [ver Figura13(3)] que ao reter o ar em seu interior impede que o líquido interaja com a superfície (CHAVES et al., 2016). Ambas as amostras exibem menores valores de energia superficial.

Ti-c.p. com o filme de CaTiO₃, depositado via sol-gel, apresentou tanto uma boa molhabilidade (baixo ângulo de contato) como maior energia de superfície, os quais indicam que superfície tornou mais hidrofílica. Constata-se que um comportamento semelhante é observado com a deposição direta de filme de apatita sobre o Ti c.p., em que o ângulo de contato diminuiu. Tendo em vista também que, ao depositar filme apatita sobre o filme intermediário de CaTiO₃ preparado via método sol-gel e por oxidação por PEO, a molhabilidade e a energia de superfície aumentam, este fato pode estar associado aos grupos hidroxilas da superfície que favorecem a formação das ligações de hidrogênio (SHIN et al., 2011) da água com os cristais de apatitas e associado a isso, a rugosidade vista na Figura22(2) que contribui com o aumento na área superficial de contato (LI et al., 2007).

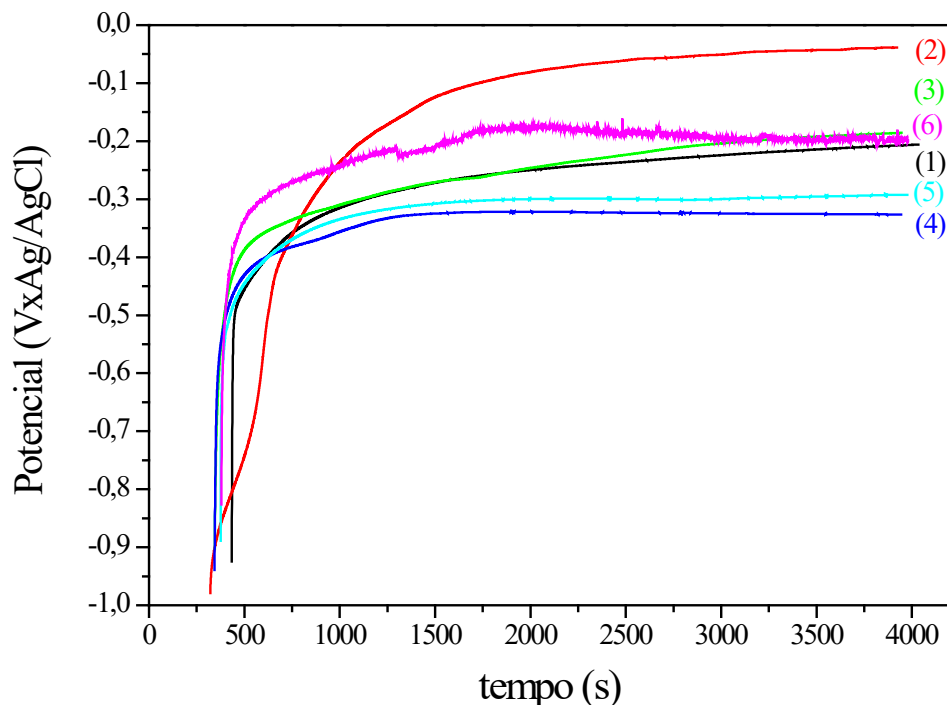
Nos estudos *in vitro* feitos por Shibata (2010) e Li (2012), demonstraram que as superfícies mais hidrofílicas melhoram a viabilidade e adesão de células de osteoblastos (SHIBATA et al., 2010) (LI et al., 2012), o que corroboram com os ensaios biológicos deste estudo. O estudo de Zinger (2004) já mencionava que a alteração da energia de superfície pode

afetar a adesão de células osteoblásticas, que preferem aderir a biomateriais que apresentam maior energia de superfície (ZINGER et al., 2004). As propriedades químicas e físicas da superfície influenciam a molhabilidade e energia de superfície do Ti-c.p. e determinam a interação com as células.

4.9 Ensaio de corrosão

O teste eletroquímico para corrosão consistiu da medida de potencial de circuito aberto e levantamento da curva de polarização, conforme descrito item 3.2.8 da metodologia. Inicialmente, o potencial de circuito aberto (OCP, do inglês *open circuit potential*) foi acompanhado por 3600 s (1h) em uma solução de Ringer-Hartmann cujos dados constam na Figura 25. Ao iniciar as medidas de potencial, observou-se uma variação grande e rápida nos primeiros 5 min, após o qual houve estabilização em valores de potencial distintos dependendo da modificação.

Figura 25. Potencial de circuito aberto, versus eletrodo de referência de Ag/AgCl, em 3600 s em solução de Ringer-Hartmann à 37°C sobre superfície das amostras de: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.

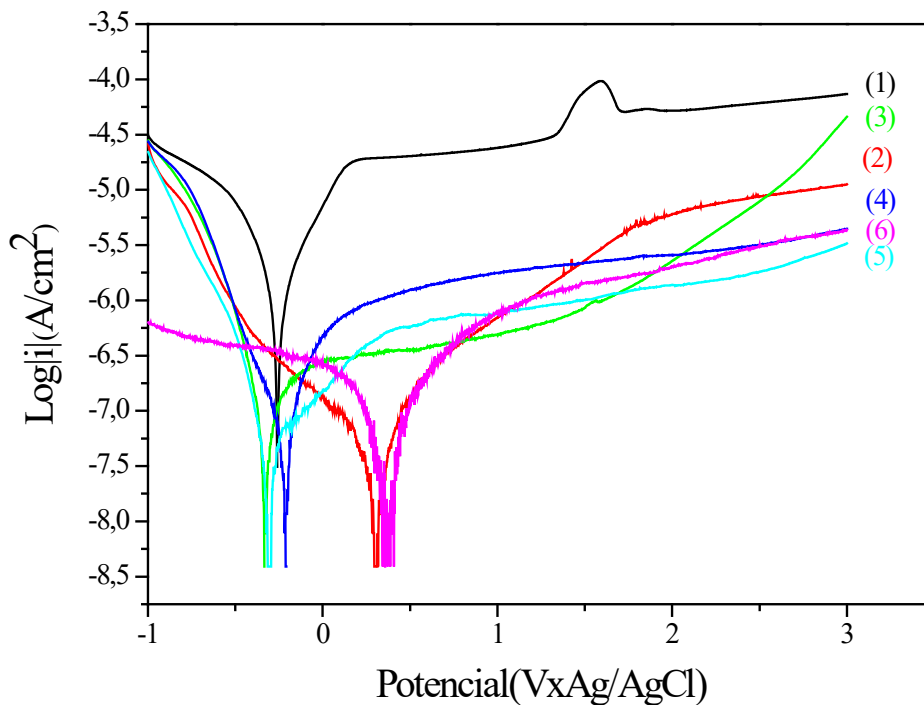


De acordo com a Figura 25, a média do OCP dos últimos 30 min (2040 a 4000 s) da amostra de Ti-c.p. com filmes modificados por CaTiO_3 via sol-gel (ver curva 2) é o mais anódico, com o valor de $-0,0528 \pm 0,01$ V vs Ag/AgCl. Significa que, mesmo sob potenciais tão

anódicos não apresenta corrente líquida de oxidação. Já as amostras de Ti-c.p sem modificação, o valor de OCP é $-0,224 \pm 0,01V$ e das modificadas pelo PEO o valor é de $-0,208 \pm 0,01V$. As modificadas por PEO e apatita, o valor de OCP é de $-0,190 \pm 0,007V$. Entretanto, amostras de Ti-c.p modificadas com $CaTiO_3$ (método sol-gel) e apatita e Ti-c.p. com apatita apresentam valores de OCP mais catódicos que dos demais, de $-0,297 \pm 0,002V$ e $-0,324 \pm 0,001 V$ vs $Ag/AgCl$, respectivamente. O tratamento térmico à $700\text{ }^\circ\text{C}$ pode ter retraído os filmes modificadores e exposto o substrato.

A Figura 26 apresenta a curva de polarização para avaliar se as modificações feitas mudaram o comportamento corrosional, ou seja, se tornaram os materiais mais suscetíveis à corrosão. A suscetibilidade à corrosão é discutida em termos de potencial de corrosão (E_{corr}) e densidade de corrente de corrosão (i_{corr}) deduzidas dessas curvas.

Figura 26. Curva de polarização em solução Ringer Hartmann, à $37\text{ }^\circ\text{C}$. Amostras: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.



Nota-se que as curvas de polarização potenciodinâmica consistem de três regiões típicas: ativa, passiva e transpassiva. A região de potencial em torno do potencial de corrosão E_{corr} (isto é $0,15\text{ V}$ mais catódico até $0,15\text{ V}$ mais anódico que o E_{corr} , que é potencial na qual a densidade de corrente líquida tende a zero, ou seja, que $\log|i|$ tende a $-\infty$) é chamado de região ativa. Nessa região, a corrente depende da cinética das reações de redução (no ramo catódico,

$E < E_{\text{corr}}$ e oxidação (no ramo anódico, $E > E_{\text{corr}}$) que depende por sua vez da natureza do material e sua superfície. Podem fornecer, portanto, informações sobre o mecanismo das reações que ocorrem na interface do material, principalmente se as reações forem estudadas em diferentes temperaturas e pHs (não feito no presente estudo). Já na região passiva ($E > E_{\text{corr}} + 0,2\text{V}$), a presença da camada de óxido (camada de passivação) formada durante a varredura nos potenciais da região ativa promove proteção e a taxa de oxidação diminui (densidade de corrente diminui). À medida que os materiais são polarizados adicionalmente, a camada passiva cresce pela oxidação de Ti, TiO e Ti₂O₃, chegando aos filmes de TiO₂ (SIMKA et al., 2013a). Essas duas regiões podem ser observadas na Figura 23 para a maioria das amostras. Somente o Ti-c.p. sem filmes modificadores parece exibir o comportamento transpassivo, na região mais anódica. Nessa região há quebra da passividade devido à heterogeneidade na superfície do metal e a corrosão ocorre por pites, formando cavidades. Também é uma região em que há desprendimento de O₂, mas parece não ocorrer neste caso.

A curva de polarização mostra valores de densidades de corrente cada vez menores com o acréscimo do filme modificador, o que indica que os métodos utilizados promovem um recobrimento eficiente e que a resistência à corrosão aumenta.

À partir dessas curvas E_{corr} , i_{corr} , b_a e b_c , foram determinadas, bem como a resistência a polarização (R_p) e taxa de corrosão (C_r) que foram calculadas utilizando as equações 4 e 5 cujos valores encontram-se listados na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos obtidos das curvas de polarização, obtidos em solução Ringer Hartmann, a 37° C, para as amostras de Ti-c.p. com diferentes modificações de superfícies.

Amostras	E_{corr} (V)	i_{corr} (A/cm ²)	R_p (Ω)	b_a (V/dec)	b_c (V/dec)	C_r (cm/ano)
(1) Ti-c.p.	-0,164	$3,13 \times 10^{-8}$	$8,08 \times 10^5$	0,162	0,090	$2,72 \times 10^{-7}$
(2) Ti-c.p. com titanato de cálcio	0,305	$1,07 \times 10^{-8}$	$23,5 \times 10^5$	0,109	0,124	$0,93 \times 10^{-7}$
(3) Ti-c.p. modificado por PEO	-0,329	$3,41 \times 10^{-8}$	$7,39 \times 10^5$	0,153	0,093	$2,05 \times 10^{-7}$
(4) Ti-c.p. com apatita	-0,211	$3,09 \times 10^{-8}$	$8,16 \times 10^5$	0,103	0,132	$2,68 \times 10^{-7}$
(5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita	-0,307	$1,79 \times 10^{-8}$	$14,1 \times 10^5$	0,131	0,105	$1,55 \times 10^{-7}$
(6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita	0,383	$1,16 \times 10^{-8}$	$21,7 \times 10^5$	0,087	0,175	$1,01 \times 10^{-7}$

O potencial de corrosão (E_{corr}), determinado pela curva de polarização, não apresentam a mesma tendência que do OCP. Este comportamento é típico do titânio em soluções que contém íons de cloreto, disponível em fluidos corpóreos (KUNST et al., 2021). Essas diferenças também podem ser observadas no trabalho de Simka e colaboradores (SIMKA et al., 2013b), atribuídas ao fenômeno de despassivação, promovido pelas mudanças de composição química da superfície durante a varredura catódica.

De maneira geral, o E_{corr} foram similares, com exceção do das amostras de Ti-c.p. contendo titanato de cálcio e Ti-c.p modificados com PEO e apatita, sendo que a i_{corr} diminuiu a cada filme depositado. No caso das amostras mencionadas, tanto o E_{corr} tem potenciais mais anódicos como a i_{corr} diminuiu.

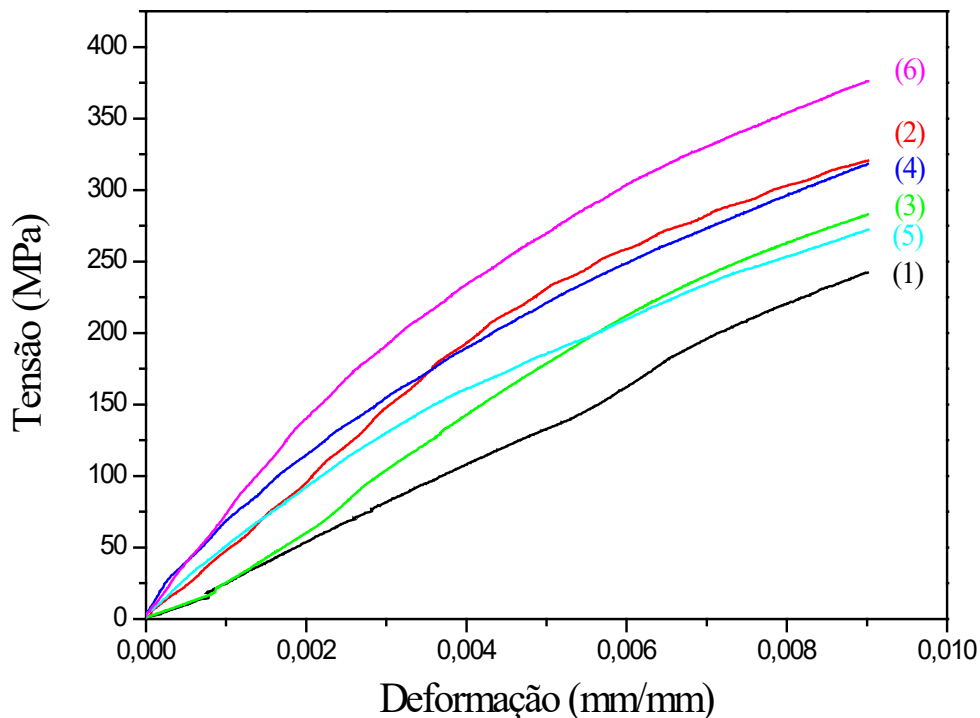
A taxa de corrosão (C_r) também diminuiu para todas modificações feitas, sendo mais expressiva quando introduziu a camada intermediária.

Resumindo, as modificações melhoraram a suscetibilidade à corrosão para todas as amostras tanto nos quesitos de E_{corr} , i_{corr} e quanto C_r , comparadas com Ti-c.p..

4.10 Ensaio Flexão de quatro pontos

Mediante o ensaio de flexão de quatro pontos, parâmetros como tensão, deformação relativa e módulo de elasticidade foram extraídos do gráfico de deformação em função da tensão (Figura 27). Em tempo, os valores da tensão em função da deformação foram obtidos dos valores de força aplicada em função do deslocamento utilizando as equações 6 e 7 dado no item 3.2.9, sendo que o deslocamento máximo foi de 1,0 mm.

Figura 27. Gráfico de Tensão versus Deformação, relativo ao ensaio de flexão em 4 pontos. Amostras (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita.



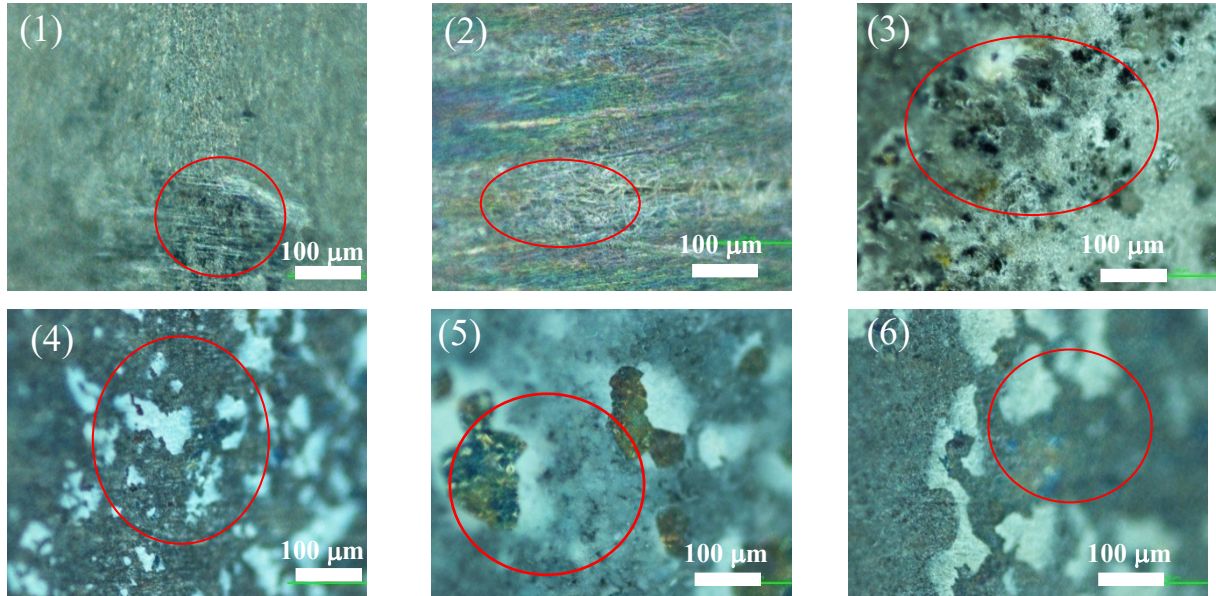
Nota-se que Ti-c.p. sem modificação apresentou o menor valor de tensão de flexão (261,98 MPa), para o deslocamento de 1,0mm. A tensão de flexão aumentou para um valor de 320,46 MPa com a deposição do filme de CaTiO_3 (via sol-gel), mas foi para 272,38 MPa quando recebeu uma camada adicional de apatita sobre a intermediária de CaTiO_3 . Contudo foi maior que do Ti-c.p. sem modificação. Em contrapartida, pelo processamento PEO com a deposição de apatita, promoveu um aumento do valor de tensão de flexão de 283,08 MPa para 376,04 MPa apresentando maior resistência à flexão entre as amostras estudadas.

O módulo elástico em flexão medido pela técnica de flexão de quatro pontos, teve menor valor de 27,14 GPa para Ti-c.p. sem modificação, visto que para implantes, o baixo módulo de elasticidade é benéfico para reduzir o *stress shielding*, que se refere à diminuição da densidade óssea pelo *stress* devido à reabsorção e conseqüente afrouxamento do implante (SUN; HAN; CUI, 2008). Há um pequeno aumento no módulo elástico para amostras de Ti-c.p. com filme de CaTiO_3 via sol-gel e apatita diretamente sobre o substrato, cujos valores foram de 31,73 e 36,09 GPa, respectivamente. Porém, com a deposição de apatita sobre camada de CaTiO_3 foi observado um leve acréscimo no módulo para 39,33 GPa. Há possibilidade de estar coligado a boa estabilidade dimensional durante a temperatura de sinterização, à qual foi submetida para a finalização do processamento sol-gel a 400 °C e 700 °C, respectivamente, e reorganização entre os átomos que compõem o substrato Ti-c.p. (JR; RETHWISCH, 2020). Houve também um aumento no valor de módulo elástico para 39,44 GPa da amostra de Ti-c.p. modificado por PEO, o que pode estar relacionado com a camada porosa de óxidos [vista na Figura 13(3)] (SOUSA; HOLANDA, 2005). Todavia, ao depositar apatita sobre a superfície modificada por PEO, o valor do módulo elástico do Ti-c.p. diminuiu para 34,46 GPa. Fato interessante, que pode estar relacionado com aumento da temperatura de sinterização da camada porosa, alterando as propriedades internas do Ti-c.p. e filmes, causando um decréscimo do módulo elástico.

Verifica-se que a modificação por diferentes métodos e tratamentos térmicos ao quais foram submetidos apresentaram interferências na propriedade mecânica em alguma extensão, embora não tenha alterado expressivamente o módulo de elasticidade do Ti-c.p. em flexão. Isso ainda é pouco discutido e não podem ser comparados com os valores da literatura. O módulo de elasticidade nestes trabalhos foi medido por tração, sendo necessários mais estudos para a correlação destas análises.

Após ensaio de flexão, dentro do intervalo de deformação elástica, analisou-se o rompimento das camadas das cerâmicas, (CaTiO_3) e (apatitas) para avaliar a sua adesão. Na Figura 28 estão apresentadas em imagens microscópicas após ensaio de flexão de quatro pontos.

Figura 28. Imagens obtida por microscópio óptico das superfícies das amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, após o ensaio de flexão: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Resolução 280x1024 px e lente 20x 0,45 10BD.



Observa-se na imagem da Figura 28(1), de Ti-c.p., que há um estiramento da superfície formando ranhuras horizontais. Isso ocorreu próximo ao ponto de apoio onde concentrou as forças de resposta para a de flexão. Nas imagens da Figura 28(2) e 28(3), os filmes de CaTiO_3 (via sol-gel) e PEO não exibiram indícios de retração da superfície, manifestando apenas o amassamento da camada, indicando assim uma maior aderência do recobrimento ao substrato. No entanto ao recobrir o Ti-c.p. com os filmes intermediários de CaTiO_3 e apatita ou camada oxidada (PEO) e apatita, cujas imagens estão mostradas na Figura 28(5) e 28(6), verificou-se um desprendimento maior do filme em comparação com a da apatita depositada diretamente sobre o Ti-c.p. [ver Figura 28(4)]. Provavelmente, os filmes depositados são a causa do aumento do módulo elástico dos materiais modificados.

4.11 Força de Adesão

A força de adesão dos filmes nos substratos metálicos de Ti-c.p. foram determinados por *pull off* seguindo o procedimento descrito no item (3.2.10). Na Tabela 8 são apresentados os resultados dessa determinação, bem como as Figura 29 mostram as fotos dos materiais após o ensaio.

Tabela 8. Força de adesão (normalizada por área) dos revestimentos nos substratos metálicos de Ti c.p.

Amostras	Força de adesão (MPa)		
	Espécime 1	Espécime 2	Média
(1) Ti-c.p.	0,69	0,71	0,70 ±0,01
(2) Ti-c.p. com titanato de cálcio	0,74	0,79	0,76 ±0,03
(3) Ti-c.p. modificado por PEO	0,91**	0,98**	0,94 ±0,05
(4) Ti-c.p. com apatita	0,88**	0,82**	0,85 ±0,04
(5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita	1,12*	1,15*	1,13 ±0,02*
(6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita	1,35**	1,42**	1,38 ±0,05**

*remoção total do filme;

** remoção parcial do filme;

Inicialmente, a adesão no substrato metálico de Ti-c.p. foi determinado. O rompimento ocorreu na interface da cola com o Ti-c.p.. A força requerida foi de 0,70 MPa, a menor entre os materiais testados, indicando que no caso da cola infiltrar nas fissuras dos filmes, não implica em aumentos na força de adesão nas demais determinações.

Os resultados dos ensaios com as amostras (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio mostraram que o rompimento ocorreu na interface do adesivo com o filme (ver Figuras 29b). Os valores determinados de 0,76 MPa são, portanto, da força de adesão da cola no filme de titanato. Sob outro enfoque, isso significa que a força de adesão do filme com o substrato é superior ao valor determinado, conforme comprovado por Figueira e colaboradores em seus estudos sobre a adesão de filmes preparados utilizando reagentes orgânicos de baixa tensão superficial sobre substratos metálicos (FIGUEIRA et al., 2016). Todavia, para determinar a adesão da camada de CaTiO₃ no Ti-c.p. necessita-se encontrar uma cola adesiva adequada.

Na amostra (3) Ti-c.p. modificado por PEO, a alta área superficial devido à rugosidade vista na Figura 22(3) e “travas mecânicas” devido à penetração da cola nos poros fortaleceram essa interface, o que fez com que o rompimento ocorresse dentro da camada produzida por PEO (fratura coesiva), conforme comprovado pela Figura 29(3). A média da força foi de 0,94 MPa e mostrou que a força de adesão do filme de PEO com o substrato é superior ao valor determinado.

No ensaio da amostra (4) Ti-c.p. com apatita, notou-se uma remoção parcial do filme de apatita (ver Figura 29(4)), sendo que na maior parte o rompimento se deu dentro da camada da apatita (fratura coesiva). A porção menor em que o rompimento foi entre a apatita e o Ti-c.p. está distribuído em toda a superfície do material indicando que a força de adesão da apatita com o Ti-c.p. e a força coesiva da apatita são semelhantes sendo a da interface ligeiramente superior. A força necessária foi de 0,85 MPa para promover a fratura coesiva e adesiva da apatita.

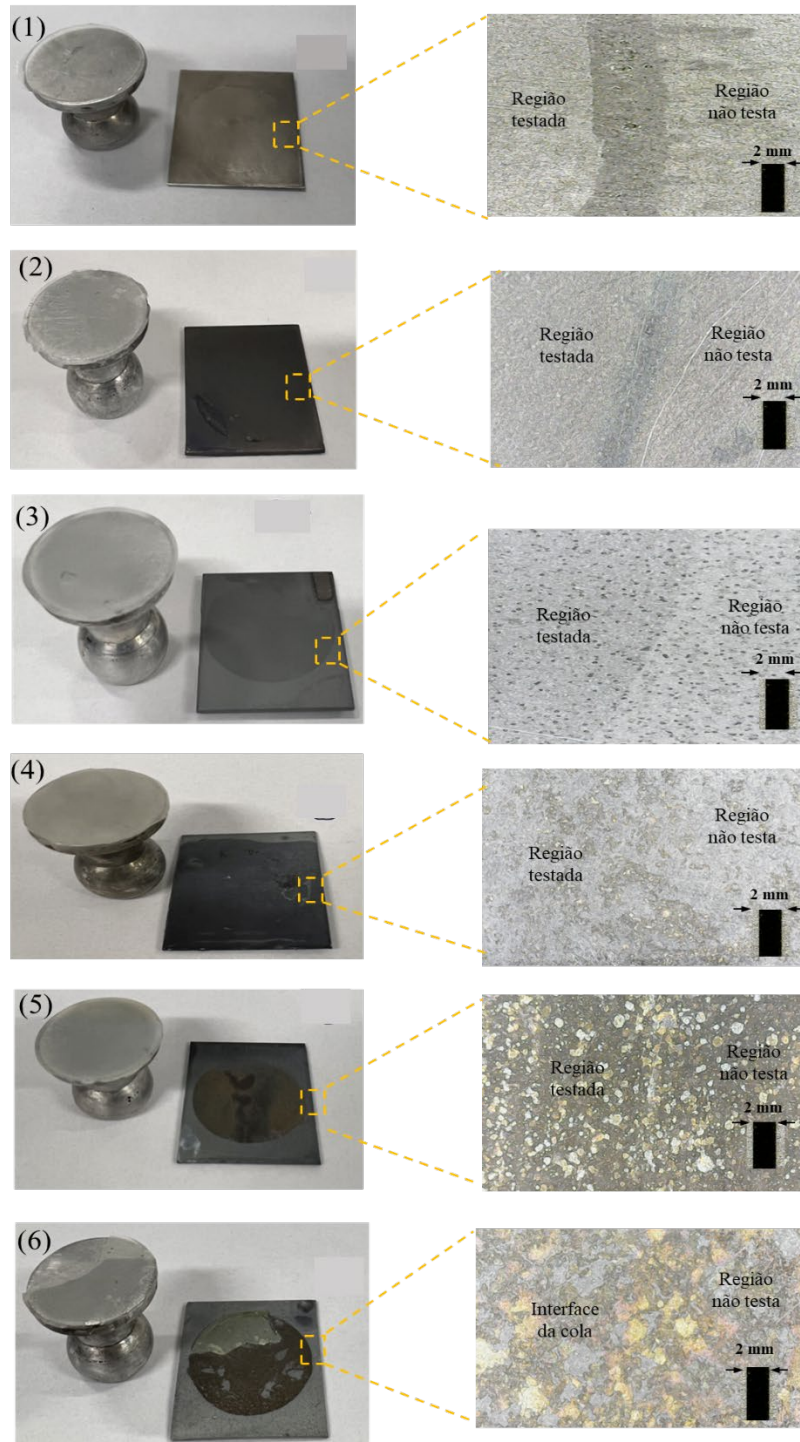
No ensaio realizado com a amostra (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita, observou-se que a remoção dos filmes foi total (fratura de natureza adesiva)[ver Figura 29(5)]. A interface rompida foi a do Ti-c.p. com o filme de CaTiO_3 , sendo a força de adesão nessa interface de 1,13 MPa. Isso mostrou também que a força de adesão da camada de CaTiO_3 obtida via sol-gel com a apatita é superior ao valor determinado, podendo ser resultado de fatores como interações químicas e/ou físicas entre as camadas.

Para a amostra (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita, é possível observar que a remoção dos filmes foi parcial, notado pela diferença de tons das superfícies após o ensaio. A área de contraste escuro no substrato, que é maior, representa a parte em que os filmes foram fraturados e a de contraste claro, a parte em que os filmes não foram. Na foto mostrando detalhes da área de contraste escuro pode se observar que o rompimento foi de natureza adesiva (da interface Ti-c.p. e camada de óxido produzida por PEO), mas parte da fratura foi coesiva (dentro da camada PEO) [ver Figuras 29(6)].

A fratura coesiva, entretanto, foi próximo à interface com o substrato e pode ser devido ao crescimento desordenado (não homogêneo na profundidade) da camada oxidada produzida por PEO (WHEELER et al., 2010). Esse ensaio mostrou também que a força de adesão da camada oxidada (PEO) com a da apatita é superior ao valor determinado (1,38 MPa), apesar de ter uma espessura 4 vezes maior que da apatita depositada sobre a camada de CaTiO_3 preparada pelo método sol-gel e 1,7 vezes mais espessa que da apatita preparada diretamente sobre o Ti-c.p.(ver Figura20(c)). Esta última apresentou uma fratura coesiva aos 0,85 MPa quando submetida ao mesmo teste. Lembrando que a fratura coesiva ocorreu também na amostra de Ti-c.p. modificada por PEO aos 0,94 MPa, esses resultados mostram que a presença da camada intermediária e o tratamento térmico ao que o conjunto foi submetido fortaleceram tanto a camada de apatita como a camada oxidada por PEO.

O rompimento da parte referente ao contraste claro foi entre o dollie e a cola indicando a necessidade de intervenções para melhorar a adesão dessa interface. Sob outro ângulo, mostrou que a força de adesão de ambas as interfaces pode ser semelhante.

Figura 29. Foto das amostras (2,5x3cm) de Ti-c.p. sem e com modificações: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita e dollies a esquerda e a direita fotomicrografia demonstrando a delimitação das regiões testada e não testada após teste de adesão. Magnificação de 1600 vezes.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

4.12 Ensaio Biológico

Este ensaio consistiu da avaliação *in vitro* da viabilidade, adesão e proliferação celular. Cabe comentar que tratam-se apenas de resultados de ensaios *in vitro*, não servindo para estendê-los para sistemas e organismos. Termos como biocompatibilidade, citotoxicidade e sinônimos utilizados nesta seção estão restritos, portanto, aos resultados de testes *in vitro*.

Avaliar se as diferentes modificações nas superfícies de titânio influenciaram na biocompatibilidade celular e favoreceram o fenótipo osteogênico e, ainda, compreender como as particularidades das superfícies dos materiais influenciaram nas respostas celulares são essenciais para o desenvolvimento de implantes mais eficazes e duráveis, contribuindo assim para o sucesso dos procedimentos de implantação e a qualidade de vida dos pacientes.

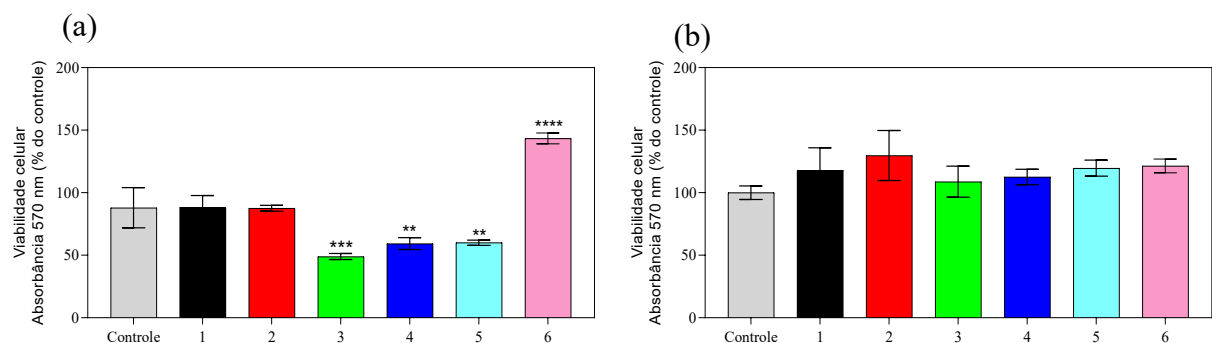
A viabilidade celular foi mensurada por meio do ensaio de MTT. Após as 72 h de tratamento, nas amostras submetidas ao contato direto (Figura 30 a), observa-se que os grupos 1 (Ti-c.p.) e 2 (Ti-c.p. com titanato de cálcio) não apresentam diferença significativa quando comparados ao controle. Já nos grupos 3 (Ti-c.p. com PEO), 4 (Ti-c.p. com apatita) e 5 (Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita), a diminuição foi significativa, enquanto que no grupo 6 (Ti-c.p modificado por PEO e apatita) houve um aumento que foi significativo. Há estudos que contribuem que a diminuição do crescimento celular pode estar relacionada com a liberação de íons presente nos filmes (BROWNE; GREGSON, 2000). Entretanto, não houve diferença significativa entre a viabilidade dos grupos de amostras no ensaio feito pelo contato indireto com os mesmos materiais (ver Figura 30 b). A presença de cálcio, fosfato e titânio iônico nos filmes modificadores não favoreceu ou prejudicou na maioria dos casos a viabilidade celular. No caso da amostra do grupo 6, ao depositar o filme de apatita sobre Ti-c.p. modificado com oxidação por PEO, aumentou-se a rugosidade com poros, e portanto a área, o que pode explicar a maior quantidade de células viáveis no grupo 6.

Cabe lembrar que na análise da viabilidade utilizando o método do MTT é avaliada pela atividade das desidrogenases mitocondriais das células viáveis. Nos estudos realizados por Esen e Long (2014), relataram que osteoblastos diferenciados reduzem a atividade mitocondrial e adotam um metabolismo energético anaeróbico que não requer a presença de atividade mitocondrial nesse processo (ESEN; LONG, 2014). Sendo assim, o aumento e diminuição na viabilidade celular podem ser discutidos em termos de prevalência de células com o metabolismo aeróbico e anaeróbico, respectivamente, assumindo provavelmente fenótipos proliferativos e de diferenciação, respectivamente.

Com relação aos grupos de contato indireto (Figura 30 b), não houve diferença estatística significativa dos grupos tratados com relação ao controle.

Adicionalmente, a literatura cita que a estabilidade química da superfície para formar HAp sobre filmes de óxidos contendo cálcio produzido com PEO, requer tratamento térmico como seu processamento final (FAZEL et al., 2021). Segundo o trabalho de Wei (2007), o CaTiO_3 gerado na superfície via PEO em ligas de titânio, seguido de tratamento à 700 °C a 800 °C, resultou em óxidos contendo CaTiO_3 com alta capacidade de cristalização e que induz o crescimento de apatitas biomiméticas, em fluido corpóreo simulado (WEI et al., 2007), o que pode explicar a melhor viabilidade observada no grupo 6 (Ti-c.p. modificado por PEO e apatita) no ensaio por contato direto.

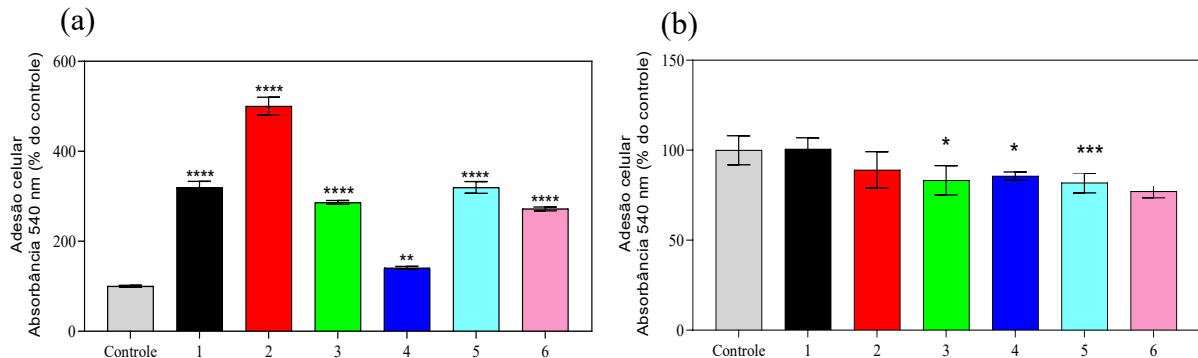
Figura 30. Ensaio de viabilidade celular de MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) contato direto e (b) contato indireto. Ambos os gráficos apresentam os grupos: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. . modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de de três experimentos independentes realizados em sextuplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p=0,0001$ e **** $p < 0,0001$



Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

Os materiais com superfícies modificadas também foram submetidos ao ensaio de adesão celular. Em contato direto (Figura 31 a), todos os grupos apresentaram aumento significativo da adesão celular quando comparadas ao grupo controle, em especial o grupo 2. Já no contato indireto (Figura 31 b), os grupos 1, 2 e 6 não apresentaram aumentos significativos quando comparados ao controle. Porém, nos grupos 3, 4 e 5 o aumento foi significativo, embora pequena quando comparada ao por contato direto. Essa observação pode ser atribuída a uma interação menos direta e eficiente entre as células e as superfícies modificadas.

Figura 31. Ensaio de adesão celular de MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) contato direto e (b) contato indireto. Ambos os gráficos apresentam os grupos: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em sextuplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p=0,0001$ e **** $p < 0,0001$



Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

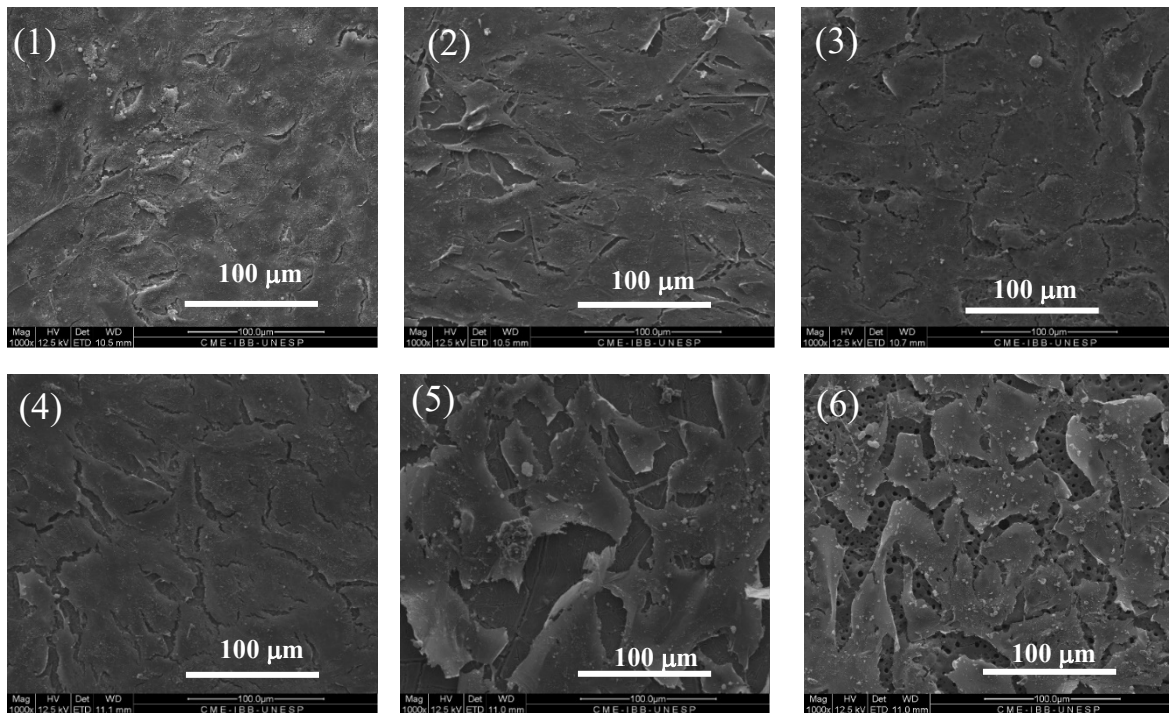
No ensaio com o grupo 4 por contato direto, a deposição da apatita sobre Ti c.p. não produziu um aumento significativo na adesão celular comparado aos outros grupos (Figura 31 a). Todavia, Balamurugan e colaboradores atribuíram esse efeito à falha causada pela fragilidade mecânica do próprio fosfato de cálcio na superfície (BALAMURUGAN et al., 2009b). Quando o CaTiO_3 foi depositado via sol-gel, a adesão aumentou em cerca de 5 vezes em relação a do controle (grupo 2) ou 1,5 vezes em relação a do Ti-c.p.. A oxidação da superfície por PEO aumentou a adesão em cerca de 3 vezes em relação ao controle e a adesão foi similar à do Ti-c.p.. As propriedades atrativas do titanato como as de favorecer a cristalização de apatitas e fortalecer a interface do filme (LEE et al., 2008) (AVÉS et al., 2009) podem ter contribuído. Resultados semelhantes foram demonstrados por Stanishevsky e colaboradores (2007) quando compararam os resultados de Ti-c.p. com filme intermediário de CaTiO_3 e Ti-c.p. com a deposição direta de apatita (STANISHEVSKY; HOLLIDAY, 2007). Observaram boa adesão, além da estabilidade nas propriedades mecânicas.

De maneira geral, a comparação dos resultados da viabilidade e adesão permite concluir que há prevalência de células em proliferar quando estão em contato direto com as superfícies modificadas pelo CaTiO_3 e prevalência de células em diferenciação (metabolismo anaeróbico) quando em contato com superfícies modificadas por PEO ou apatita, exceto sobre a superfície modificada por PEO e apatita, em que prevalece células em proliferação.

Visando avaliar se a modificação da superfície do Ti-c.p. teria influência na morfologia dos pré-osteoblastos, foi feita a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Essa avaliação

foi feita após 7 dias em contato direto das células com as amostras e os resultados são apresentados na Figura 32. Sobre a maioria das superfícies de Ti-c.p., modificadas ou não, observou-se um bom espriamento e sobreposição de camadas celulares em 7 dias, indicando que as superfícies testadas favoreceram a adesão das células de pré-osteoblastos. A análise mais cuidadosa da Figura 32 permite dizer ainda que as células destacaram-se da superfície de Ti-c.p. contendo filme intermediário de CaTiO_3 via sol-gel e PEO e apatita [grupos (5) e (6)]. Pelas aberturas formadas, pode-se comparar a morfologia das superfícies antes (ver Figura 13) e após 7 dias de cultura celular e notar que a camada de apatita encontra-se consumida nestes materiais. A camada intermediária parece disponibilizar a apatita tal que a viabilidade e/ou a adesão sejam maiores.

Figura 32. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de células MC3T3-E1 cultivados em contato direto por 7 dias com as seguintes superfícies: (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita. Detector de elétrons secundários, com magnificação 1000x.



Na sequência, foi feita a avaliação do perfil molecular das células MC3T3 quanto à expressão dos genes referentes a adesão, fenótipo e remodelamento da matriz extracelular (ECM), visto que estes desempenham papéis cruciais na formação e manutenção do tecido ósseo. A avaliação foi feita por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR) e os resultados estão mostrados nas Figuras 33 à 35.

Primeiramente foram avaliados os genes relacionados a adesão celular: *Integrina- α 1*, *Integrina- β 1*, *Fak*, *Cofilina* e *Col3a1* (ver Figura 33). Com relação a expressão gênica de *Integrina- α 1* e *Integrina- β 1* (Figura 33 a e b), não houve diferenças significativas para todos os grupos em comparação ao controle. Apenas, houve um aumento significativo na expressão da *Integrina- α 1* no grupo tratado com meio osteogênico (M.O.). Na expressão gênica de *Fak* (Figura 33 c), notou-se uma diferença significativa apenas no grupo 6, em comparação com o controle, valendo a mesma análise na avaliação da expressão gênica de *Cofilina* (Figura 33 d). Com relação a expressão gene *Col3a1* (Figura 33 e) não houve diferenças estatísticas significativas.

Esses resultados podem ser interpretados de maneiras diversas. Pode ser atribuída ao aumento na quantidade de uma proteína nas células em resposta ao meio condicionado com determinadas superfícies, resultando na diminuição da expressão gênica. É importante considerar também outros mecanismos como: possíveis interações com microRNAs, que podem contribuir para essa regulação pós-transcricional. Sabendo-se que, as células pré-osteoblásticas têm o potencial de se diferenciar em osteoblastos, responsáveis pela síntese e mineralização da matriz óssea (DHAVALIKAR et al., 2020), a adesão é essencial para a formação adequada do osso e para a resposta adaptativa a lesões quando for o caso (YU et al., 2018). Essas células também secretam componentes para remodelamento da matriz extracelular (ECM), fornecendo estrutura e suporte para a mineralização óssea e ancoragem celular (DOU et al., 2018). Além disso, as células pré-osteoblásticas remodelam a matriz extracelular para substituir o tecido ósseo antigo por osso novo. Esses processos são regulados por sinais químicos e mecânicos, influenciando a expressão gênica, atividade enzimática e diferenciação celular (CHEN et al., 2017).

O entendimento e a manipulação desses processos são de extrema importância para a regeneração do tecido ósseo. Destaca-se a relevância da adesão celular mediada pelas Integrinas, que são compostas por uma família de subunidades α e β . Essas Integrinas desempenham um papel essencial na transdução de sinais e estabelecem conexões com proteínas presentes na matriz extracelular (ECM) e outras proteínas de sinalização que estão envolvidas nos processos de proliferação e migração celular (AIYELABEGAN; SADRODDINY, 2017). Porém nem todas as proteínas, membros da mesma família, são requeridas para todas as situações. Contudo, é possível afirmar que houve uma demanda biológica comparável as do grupo controle para a expressão de *Integrina- α 1* e *Integrina- β 1*. A ativação da Integrina facilita a interação com outras proteínas-chave nessa cascata de sinalização celular, como *Fak*, que demonstraram expressões gênicas significativas em contato

indireto com as superfícies modificadas (MITRA; SCHLAEPFER, 2006). No entanto, para obter afirmações mais robustas nesse sentido, são necessários ensaios adicionais que investiguem o envolvimento dos demais genes codificadores dos diferentes membros dessa família de proteínas (PARK et al., 2015).

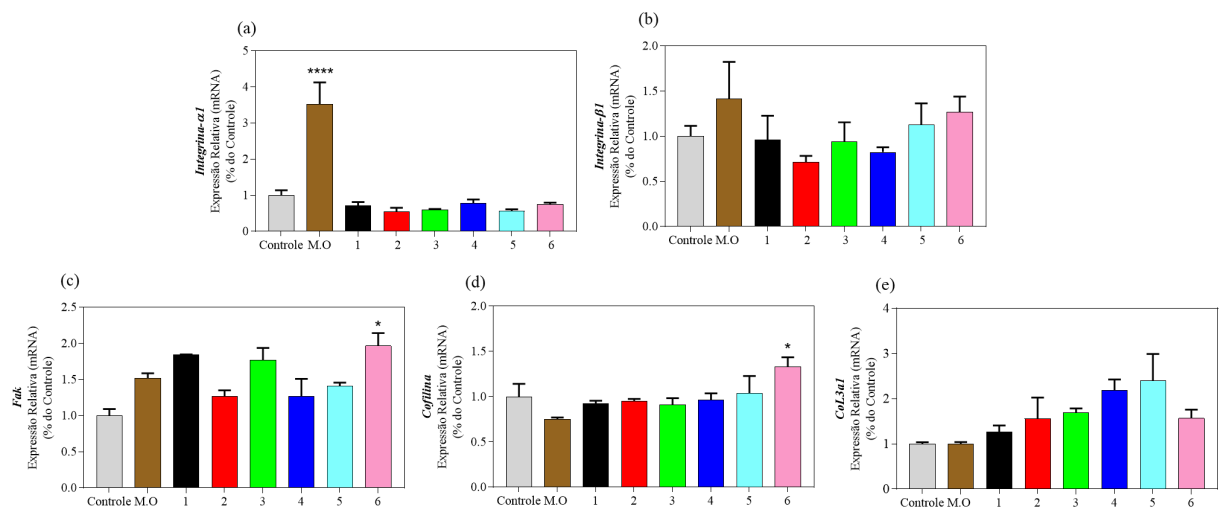
Conforme mencionado acima, realizou-se também a análise da expressão gênica de *Fak* (Figura 33 c), *Cofilina* (Figura 33 d) e *Col3a1* (Figura 33 e), da plataforma de adesão e remodelamento da ECM, sendo que os dois primeiros são responsáveis pela codificação da proteína relacionada aos pontos de adesão. Não foram observadas reduções estatisticamente significativas na expressão gênica de ambos os genes, com exceção da expressão de *Cofilina* no grupo cultivada em M.O. (Figura 33 d), a qual apresentou uma leve tendência de redução. Pode-se inferir que tanto *Fak* quanto a *Cofilina* apresentaram um perfil de expressão superior no grupo 6 (Ti-c.p. modificado por PEO e apatita) em relação ao controle, indicando a insuficiência na quantidade de proteínas que desempenham a função dos pontos de adesão focal durante o processo de adesão celular em meios condicionados com superfícies desse material. Comumente, a adesão celular demanda alterações substanciais na morfologia celular (ver Figura 32), as quais são mediadas pela complexa rede de componentes do citoesqueleto (DA COSTA FERNANDES et al., 2018).

Os resultados também revelam níveis de expressão sem muita alteração em comparação ao controle para *Cofilina* sendo significativa somente para o grupo 6 (Ti-c.p. modificado por PEO e apatita), que apresenta níveis mais elevados de expressão. Este aumento expressivo pode estar relacionado à melhor viabilidade celular na interação com o material (ver Figura 26a). Essas observações estão alinhadas com as investigações de Chetty (2012), onde a presença do filme de apatita gera estímulos mecânicos e químicos que ativam vias de sinalização intracelular, resultando no aumento da expressão do gene da *Cofilina*. A camada intermediária proporcionada por PEO parece maximizar este estímulo e ativação. Além disso, o filme de apatita promove a adesão e migração celular, estimulando a formação de estruturas celulares dependentes da atividade da Cofilina. Esses mecanismos estão relacionados à reorganização do citoesqueleto de actina e facilitam a resposta celular ao material (CHETTY et al., 2012). No entanto, mais estudos são necessários para uma compreensão mais detalhada dos mecanismos moleculares envolvidos nessa resposta.

A expressão do gene *Colla3* é aumentada nas amostras que contêm cálcio, que é o componente principal da apatita. O cálcio ativa vias de sinalização intracelular, como a via dos fatores de crescimento ósseo, estimulando a expressão do gene *Colla3* e aumentando a produção de colágeno tipo I. Além disso, o ambiente biomimético criado pelo filme de apatita

imita a matriz extracelular do tecido ósseo, fornecendo estímulos adequados para as células aumentarem a expressão do gene *Colla3*. Essas constatações estão em consonância com os estudos de Hing (2004), que mostram que o gene *Colla1* é responsável pela codificação da cadeia 1 do Coll, componente mais abundante da matriz óssea (HING, 2004).

Figura 33. Expressão de genes envolvidos no processo de adesão celular de células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) *Integrina- α 1*; (b) *Integrina- β 1*; (c) *Fak*; (d) *Cofilina*; (e) *Col3a1*. Todos os gráficos apresentam os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata em comparação com Ctrl. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

Os genes *Bsp*, *Runx-2* e *Otc* desempenham papéis importantes nas células MC3T3, sendo responsáveis por modular processos como diferenciação celular. Tanto na avaliação de *Bsp* (Figura 34 a) quanto de *Runx-2* (Figura 34 b) e *Otc* (Figura 34 c), não foi observada uma diferença estatística significativa das expressões na comparação entre grupos, com a ressalva de que a expressão por células cultivadas com meios condicionados com materiais contendo apatita foi maior que sobre amostras sem apatitas. Contudo, quando comparado com a do controle e grupo com M.O., a expressão foi substancialmente menor.

Os níveis relativos de expressão do mRNA do gene *Bsp* (sialoproteína óssea) não apresentou significância estatística ao comparar entre os grupos. No entanto, a sua expressão é na ordem de 10% quando se compara com a do grupo de controle (Figura 34). Se o gene *Bsp* não está sendo expresso e a matriz mineralizada ainda não formou, pode indicar que as células encontram-se ainda num estágio inicial da formação óssea ou há uma disfunção no processo de mineralização (GORDON et al., 2007). O gene *Bsp* desempenha um papel fundamental na

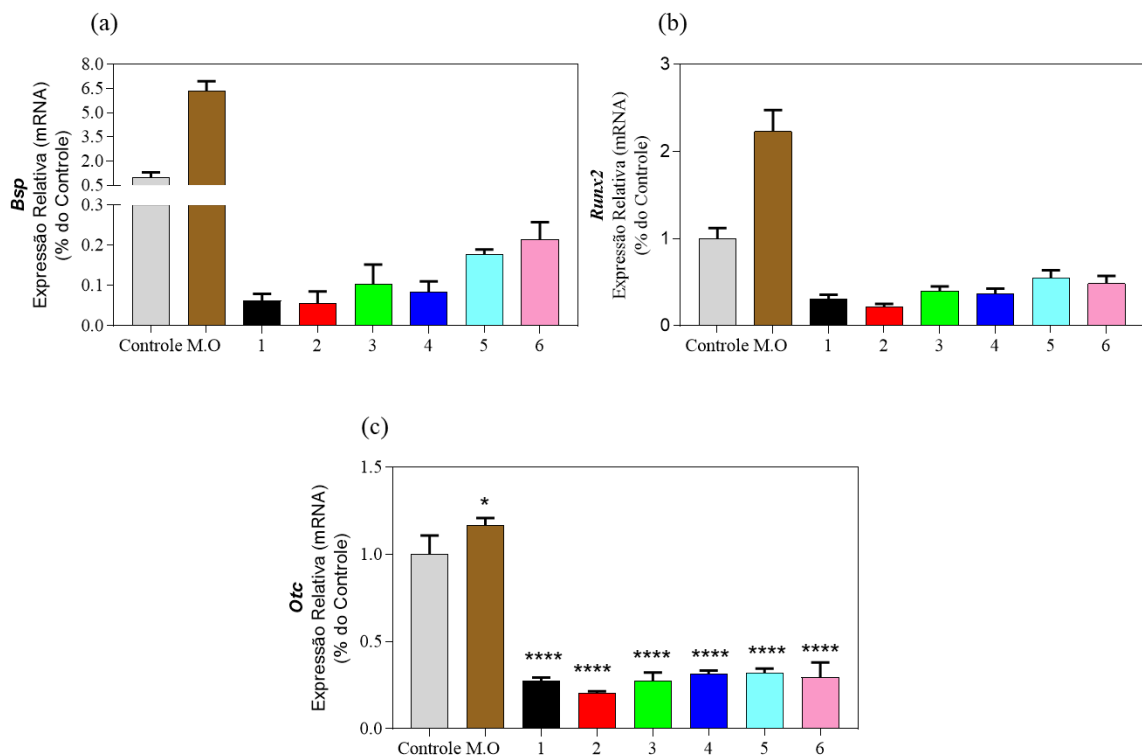
nucleação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita, que são responsáveis pela mineralização óssea (DONATO, 2009). A mineralização óssea é um processo complexo que envolve a deposição de minerais, como cálcio e fosfato, na matriz extracelular produzida pelos osteoblastos responsáveis pela resistência do osso (MENDONÇA et al., 2010). A expressão inadequada do gene *Bsp* em meios condicionados com as superfícies analisadas pode comprometer a integridade estrutural do tecido ósseo (ZHANG et al., 2016). Contudo, a mineralização, estudada *in vitro* pela da marcação com o vermelho de Alizarina, cujos resultados serão mostrados na Figura 38 adiante, comprovaram que todos os grupos exibiram mineralização superior a do controle, com destaque para o grupo 6. Em outras palavras, a mineralização celular foi antecipada comparada com a dos controles, em resposta ao meio condicionado com as superfícies, favorecendo fenótipos de pré-osteoblastos que resulta na queda de expressão do gene *Bsp* aos 14 dias de cultura.

A análise da expressão do gene *Runx-2* é importante, pois é requerido para a transformação das células pré-osteoblásticas em osteoblastos maduros (ZIROS; BASDRA; PAPAVASSILIOU, 2008). Sua atividade regula a diferenciação celular, especialmente para a formação dos osteoblastos, células responsáveis pela produção da matriz óssea. O *Runx-2* ativa outros genes envolvidos na síntese de colágeno tipo I, a principal proteína estrutural do osso, e da osteocalcina, uma proteína que desempenha um papel crucial na mineralização óssea (KOMORI, 2002). O colágeno tipo I fornece a estrutura e a resistência mecânica necessárias para o osso (LI et al., 2002). No estudo de Khan (2012), demonstraram que o pico de expressão do gene *Runx-2* aconteceu 24 horas após as células terem sido cultivadas, sendo que esta atividade celular específica reduziu com o decorrer dos períodos (KHAN et al., 2012), o que corrobora com os resultados deste estudo. O *Runx-2* é requisitado nos estágios iniciais de diferenciação, porém sendo esse o resultado após 14 dias, é compreensível que o nível de expressão esteja baixo. Além disso, o nível de expressão é substancialmente menor que dos dois controles. Estes dados podem ser um indicativo de uma diferenciação celular precoce (ZIROS; BASDRA; PAPAVASSILIOU, 2008), sendo que a maturação celular dentro do fenótipo de pré-osteoblastos resulte na queda de expressão.

Já o gene *Otc* está relacionado ao metabolismo da ornitina, um aminoácido essencial para a síntese de colágeno ósseo. A expressão adequada do *Otc* é necessária para fornecer ornitina como substrato para a produção de colágeno, que contribui para a flexibilidade e resistência do tecido ósseo (NASKAR et al., 2017). O nível de expressão apresentou-se sem muita alteração entre os grupos, sendo que o nível de expressão pelas células cultivadas em meios condicionados com materiais contendo apatita foi de 10% à 15% mais elevado. Porém,

em relação ao dos controles, o nível de expressão foi substancialmente inferior. Assim como para *Runx-2*, estes dados pode ser um indicativo de uma diferenciação celular precoce.

Figura 34. Expressão de genes marcadores ósseos de células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) *Bsp*; (b) *Runx-2*; (c) *Otc*. Todos os gráficos apresentam os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata em comparação com Ctrl. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.



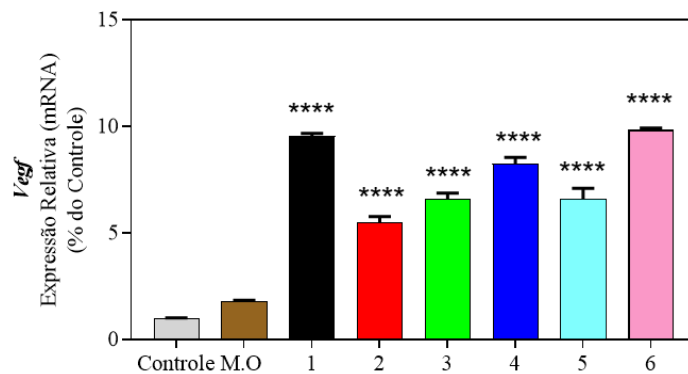
Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

Em seguida, foi feita a análise do gene do fator de crescimento endotelial vascular, *Vegf* (Figura 35), avaliando sua associação com a revascularização. O fator de crescimento endotelial vascular (*Vegf*) é uma proteína que estimula a angiogênese e vasculogênese, desempenhando um papel fundamental no restabelecimento do suprimento de oxigênio aos tecidos quando a circulação sanguínea é insuficiente (BAPTISTA, 2010). Houve uma diferença significativa e importante no nível de expressão nos grupos de 1 à 6 quando comparado com o dos controles, sendo o dos grupos 1 e 6 os que apresentaram aumentos mais expressivos (9 vezes).

Os níveis de expressão dos genes relacionados com a adesão celular (*Integrina- α 1*, *Integrina- β 1*, *Fak*, *Cofilina* e *Col3a1*) foram todos comparáveis ao do controle indicando que as respectivas proteínas continuaram sendo requisitadas para promover a adesão celular. Por outro lado, os níveis de expressão dos genes responsáveis pela diferenciação celular (*Bsp*,

Runx-2 e *Otc*) foram todos substancialmente inferiores ao do controle. Foram inferiores inclusive do que do grupo com o meio osteogênico (M.O.). Estes dados indicam a ocorrência de uma diferenciação celular precoce. Os resultados da viabilidade e adesão celular corroboram com essa observação. Entretanto, para que o processo de proliferação e diferenciação prossiga necessita da irrigação sanguínea (vascularização), estimulando-se assim a expressão de *Vegf*.

Figura 35. Expressão do gene *Vegf* em células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações. Todos os gráficos apresentam os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata em comparação com Ctrl. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

Na análise subsequente, os genes relacionados à matriz extracelular (MEC) foram avaliados considerando tanto a expressão gênica (*Mmps* e *Timps*) quanto a atividade enzimática das metaloproteinases (*Mmps*). Na avaliação da expressão gênica de *Timp1* (Figura 36 a), *Timp2* (Figura 36 b) e *Mmp2* (Figura 36 c), não houve diferença significativa quando comparado ao controle. Entretanto, *Mmp9* (Figura 36 d) apresentou uma diferença estatística significativa e importante nos grupos M.O., 1, 2, 3 e 4, que tiveram uma baixa expressão gênica, especialmente nos grupos M.O. e 2.

Com relação a análise de Zimografia (Figura 33 g) foram feitas a avaliação de *Mmp2* (Figura 36 e) e *Mmp9* (Figura 36 f). Para *Mmp2*, notou-se uma elevação na quantidade dessa enzima nos grupos M.O., 1, 2, 3 e 4 quando comparados a do controle, dessa vez com destaque ao grupo 2. Para *Mmp9*, observou-se uma tendência semelhante, sendo que os grupos 1, 2, 3, 4 e 6, tiveram uma quantidade elevada quando comparado a do controle.

Durante a diferenciação dos osteoblastos, ocorre uma cuidadosa regulação da remodelação extracelular, na qual as metaloproteinases da matriz (*Mmps*) e seus inibidores

teciduais, os Timps, desempenham um papel fundamental. Essas proteínas interagem de forma harmoniosa para garantir a regulação adequada da atividade das Mmps, permitindo que a remodelação da matriz extracelular ocorra de maneira coordenada e controlada (LIU; CHAUDHURI; PAREKH, 2017). Além disso, os Timps têm mostrado uma notável capacidade de responder às propriedades das superfícies celulares, adaptando-se às condições específicas durante a diferenciação dos osteoblastos. Isso destaca a importância desses mecanismos de regulação na formação e função adequadas do tecido ósseo (MIZUTANI et al., 2001). Significa ao final que o Timp2, um inibidor tecidual das metaloproteinases da matriz (Mmps), desempenha um papel importante no processo de diferenciação dos osteoblastos. Ele atua regulando a atividade das Mmps, que são enzimas responsáveis pela remodelação da matriz extracelular (FILANTI et al., 2000).

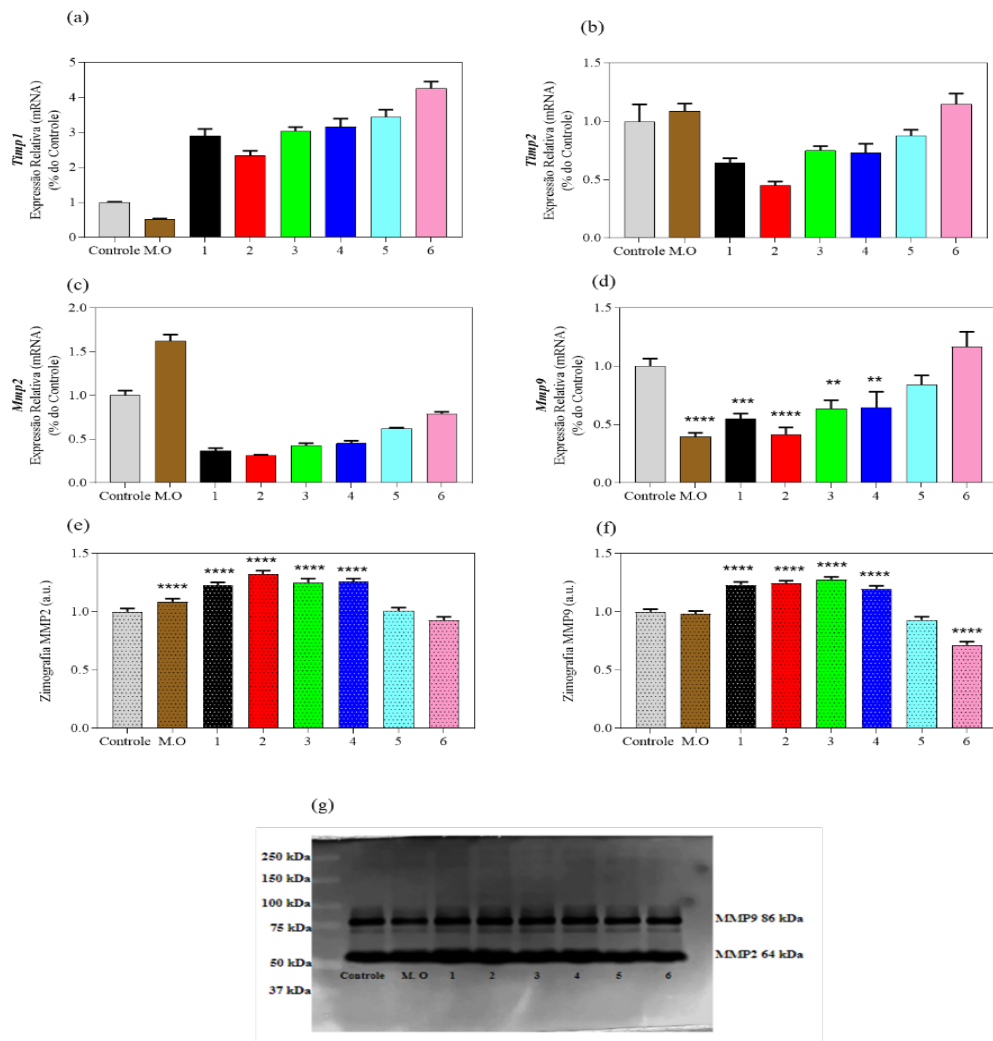
A influência positiva do Timp2 na atividade das Mmps sugere que ele contribui para a regulação adequada da remodelação da matriz durante a diferenciação dos osteoblastos. Essa regulação é essencial para a formação e manutenção adequada do tecido ósseo. A expressão dos genes *Mmp2* e *Mmp9*, juntamente com a atividade enzimática, indica a ocorrência de uma remodelação na matriz extracelular nas diversas superfícies modificadas, corroborando com estudos anteriores (COROTTI et al., 2009).

Com base nesses conhecimentos, torna-se evidente a importância de estudar e compreender os mecanismos de regulação das Mmps e Timps. Ao compreender como as Mmps e Timps interagem e regulam a remodelação da matriz extracelular, obtêm-se *insights* valiosos sobre os eventos celulares e os mecanismos envolvidos em processos como cicatrização de feridas, regeneração tecidual e angiogênese (OMAR et al., 2011). Essas enzimas são responsáveis por quebrar e remodelar componentes da matriz, permitindo a reorganização e a renovação do tecido (BEERTSEN et al., 2002). No entanto, a atividade das MMPs precisa ser estritamente controlada para evitar um desequilíbrio na degradação da matriz. Os inibidores teciduais das metaloproteinases (Timps) são proteínas específicas que regulam a atividade das Mmps, formando complexos estáveis com as enzimas e inibindo sua ação proteolítica (COTRIM et al., 2002).

Fundamentando-se nisso, observou-se um aumento das atividades principalmente nos grupos 1 (Ti-c.p.) 2 (Ti-c.p. com titanato de cálcio), 3 (Ti-c.p. modificado por PEO) e 4 (Ti-c.p com apatita) em *Mmp2* e *Mmp9*. Por outro lado, nos grupos 5 (Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita) e 6 (Ti-c.p modificado por PEO e apatita), nos quais foram adicionados filmes de apatita sobre a camada intermediária, observou-se uma tendência de diminuição da atividade das Mmps. Essas diferenças na atividade das Mmps podem ser atribuídas às interações entre as

superfícies modificadas e as células. A presença de superfícies modificadas, como o titanato de cálcio e a apatita, pode afetar as vias de sinalização intracelular e os fatores de transcrição que regulam a expressão das Mmps (SCISLOWSKA-CZARNECKA et al., 2012). Além disso, essas superfícies podem influenciar a adesão e a interação das células com a matriz extracelular, afetando indiretamente a atividade das Mmps. A importância dessas observações está relacionada ao entendimento dos mecanismos de remodelação da matriz extracelular em resposta a diferentes superfícies (SHUBAYEV et al., 2004). A capacidade de modular seletivamente a atividade das Mmps pode ter implicações clínicas significativas.

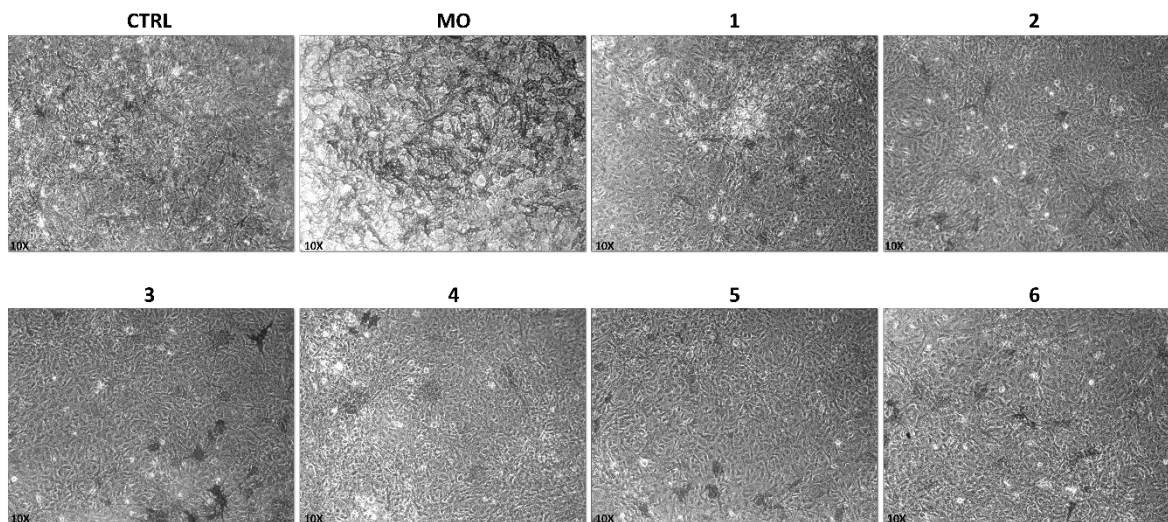
Figura 36. Expressão de genes de remodelamento de matriz extracelular e zimografia de células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, onde (a) *Timp 1*; (b) *Timp 2*; (c) *Mmp2*; (d) *Mmp9*; (e) Zimografia de *Mmp2*; (f) Zimografia de *Mmp9*; (g) Gel de Zimografia. Todos os gráficos apresentam os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p. com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p. modificado por PEO e apatita. Os resultados são representados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata em comparação com Ctrl. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.



Finalmente, foram realizados os ensaios de fosfatase alcalina (Alp) (Figura 37) e vermelho de alizarina (Figura 38) nas células MC3T3, buscando avaliar como a modificação da superfície influenciaria no processo de mineralização após o contato com as células.

Na Figura 37 observa-se o resultado da avaliação da atividade da enzima Fosfatase Alcalina (Alp) feita pelo método de coloração. As manchas escuras indicam a presença do Alp e podem ser visualizadas em todas as micrografias. Essas manchas são mais frequentes nas culturas de células com o meio condicionado com as amostras de Ti-c.p. modificados ou não que no controle negativo. Nota-se também manchas brancas que, provavelmente, indicam a mineralização (depósitos de cálcio). A mineralização é mais intensa no grupo M.O. como era de se esperar, porém os grupos 1 e 4 apresentam mineralizações semelhantes às do grupo controle. Num trabalho futuro, as micrografias serão feitas tal que número de fotos seja estatisticamente representativo.

Figura 37. Ensaio de ALP em células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações. A figura apresenta os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita.



No ensaio com vermelho de alizarina, cujos resultados estão mostrados na Figura 38, nota-se que todos os grupos obtiveram mineralização superior a do controle, com destaque para o grupo 6. As áreas correspondentes às regiões de coloração vermelha foram integradas e exibidas em forma de gráfico em barra na Figura 39. Nota-se que a mineralização do grupo 6 foi maior que do grupo com M.O. O cálcio depositado na superfície pode facilitar a mineralização e renovação óssea (SEKARAN; VIMALRAJ; THANGAVELU, 2021). Da mesma forma, isso pode fornecer uma base estrutural para o desenvolvimento da matriz extracelular (ALLOISIO et al., 2021).

Figura 38. Ensaio de vermelho de alizarina em células MC3T3-E1, com as amostras de Ti-c.p. sem e com modificações, sendo (a) imagem das células e (b) identificação da cor vermelha pelo ImageJ. A figura apresenta os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita.

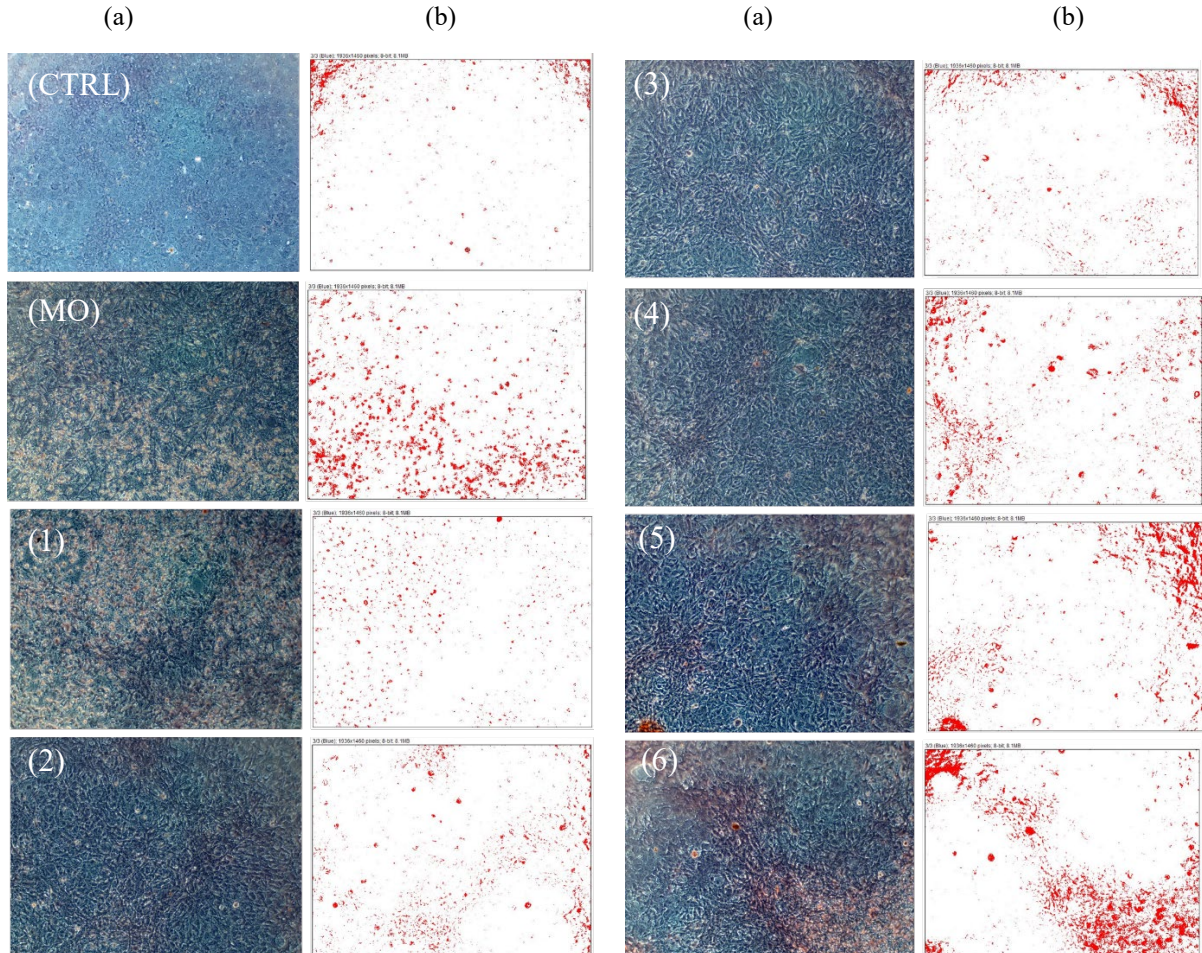
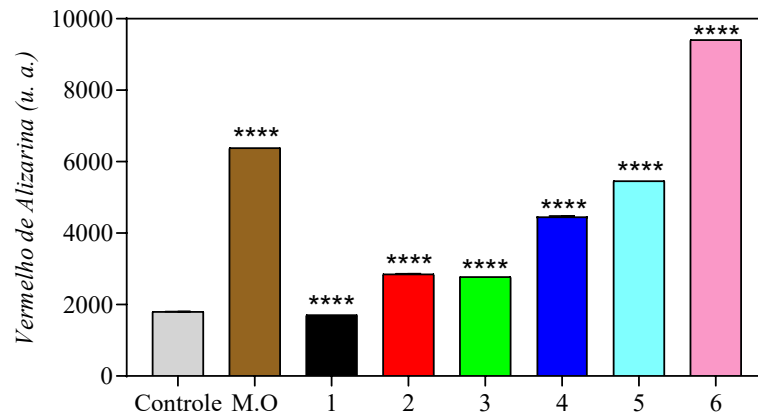


Figura 39. Gráfico da quantificação da coloração vermelho de alizarina das imagens óticas pelo ImageJ. A figura apresenta os grupos: Controle (CTRL); Meio osteogênico (M.O.); (1) Ti-c.p.; (2) Ti-c.p. com titanato de cálcio; (3) Ti-c.p. modificado por PEO; (4) Ti-c.p com apatita; (5) Ti-c.p. com titanato de cálcio e apatita e (6) Ti-c.p modificado por PEO e apatita.



5 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve por objetivo modificar a superfície do Ti-c.p. pela deposição de filmes finos intermediários de titanato de cálcio pelo método sol-gel e por oxidação eletrolítica assistida por plasma (PEO), seguida da deposição de apatita para melhorar a integração com o osso. Diante disso, pode se concluir que:

- A caracterização feita por DRX mostraram que os filmes intermediários se estruturaram como titanato de cálcio e óxido de titânio anatásio quando depositado pelo método sol-gel e mistura de óxido de titânio rutilo e anatásio e titanato de cálcio, quando oxidado por PEO;
- O refinamento estrutural do difratograma do pó de apatita confirmou que com o método sol-gel seguido de tratamento à 700°C obtêm-se apatitas compostas por uma mistura de 59,6% em hidroxiapatita e 40,4% em β -TCP e que a composição deve ser similar ao ser sintetizar na forma de filmes sobre o substrato de Ti-c.p. contendo ou não camadas intermediárias;
- As imagens de MEV-EC mostraram que a superfície modificada com filmes de titanato de cálcio com método sol-gel apresenta morfologia com trincas e rachaduras. Já o processamento PEO produz uma superfície porosa;
- A deposição do filme de apatita sobre Ti-c.p. contendo ou não camada de CaTiO_3 proporcionou recobrimentos com rugosidade na superfícies;
- A perfilometria de contato revelou que a rugosidade (em escala micrométrica) diminuiu com a deposição de camadas intermediárias, mas aumentou com a deposição de apatitas, entretanto, quando analisadas por AFM (escala nanométrica), a tendência observada foi oposta. A deposição de filmes intermediários aumentou substancialmente a rugosidade e a deposição de apatita a diminuiu;
- Os filmes modificadores proporcionaram uma superfície mais resistente à corrosão, bem como não alteraram significativamente as propriedades mecânicas do Ti-c.p.;
- As modificações proporcionaram uma superfície mais hidrofílica com maior energia de superfície, com exceção da modificação por PEO;
- Os filmes intermediários, juntamente com o tratamento térmico ao qual o conjunto foi submetido, fortaleceu tanto a camada de apatita quanto a camada oxidada por PEO, promovendo um aumento na força de adesão do filme de apatita ao substrato de titânio;

- O ensaio biológico por contato direto mostrou que em comparação ao controle, as amostras apresentaram viabilidade e adesão celular maior na presença Ti-c.p. e maior ainda quando recoberto com a camada intermediária de filmes contendo CaTiO_3 preparado pelo método sol-gel ou processado por PEO. Em contrapartida, a amostra de contato indireto não demonstrou diferenças significativas em relação ao controle;
- Na análise RT-qPCR, foi demonstrado que as diferentes modificações da superfícies influenciaram a capacidade de modular a expressão de genes envolvidos na diferenciação osteoblástica, na síntese de matriz extracelular, expresso pelas diferenças encontradas nas metaloproteinases, assim como o estímulo angiogênico caracterizado pela expressão *Vegf*;
- O ensaio de fosfatase alcalina por coloração e mineralização por vermelho de alizarina e coloração de Alp indicam que os meios condicionados pelos materiais induziram o aumento da mineralização das células quando comparado ao controle, mostrando assim, potencial para novas aplicação de regeneração óssea.

6 REFERÊNCIA

- ADWAN, H.; BÄUERLE, T. J.; BERGER, M. R. Downregulation of osteopontin and bone sialoprotein II is related to reduced colony formation and metastasis formation of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Cancer Gene Therapy**, v. 11, n. 2, p. 109–120, fev. 2004.
- AIYELABEGAN, H. T.; SADRODDINY, E. Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 956–970, 1 abr. 2017.
- AKIN, F. A. et al. Preparation and analysis of macroporous TiO₂ films on Ti surfaces for bone-tissue implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 57, n. 4, p. 588–596, 2001.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v. 10, n. 2, p. S96–S101, 1 out. 2001.
- ALLOISIO, G. et al. Effects of Extracellular Osteoanabolic Agents on the Endogenous Response of Osteoblastic Cells. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2383, set. 2021.
- ALVES, A. C. et al. Corrosion mechanisms in titanium oxide-based films produced by anodic treatment. **Electrochimica Acta**, v. 234, p. 16–27, 20 abr. 2017.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS ASTM E855-08. **E855-90 (2000): Standard test methods for bend testing of metallic flat materials for spring applications involving static loading.** Disponível em: <https://webstore.ansi.org/Standards/ASTM/astme85508?gclid=CjwKCAjw7eSZBhB8EiwA60kCWxaYv1m6G8xLVvFg-3-I7y6qQ5nbMalv08DFITYrCdHVLNwWGVImdRoCXYcQAvD_BwE>. Acesso em: 2 out. 2022.
- ARDHY, S. et al. Improvement in Bioactivity Properties of Hydroxyapatite Coated Ti-6Al-4V ELI with Addition of Zirconium Oxide for Orthopaedic Implant. **Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering**, v. 59, p. 81–89, 2023.
- ASTM INTERNATIONAL ASTM F 2129-01. **Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements to Determine the Corrosion Susceptibility of Small Implant Devices.** Disponível em: <<https://www.scribd.com/document/470844533/ASTM-F-2129-2008-Standard-Test-Method-for-Conducting-Cyclic-Potentiodynamic-Polarization-Measurements-to-Determine-the-Corrosion-Susceptibility-of-Sma>>. Acesso em: 11 ago. 2022.
- AVÉS, E. P. et al. Hydroxyapatite coating by sol-gel on Ti-6Al-4V alloy as drug carrier. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 543–547, 1 fev. 2009.
- BAIL, A. L. Whole powder pattern decomposition methods and applications: A retrospection. **Powder Diffraction**, v. 20, n. 4, p. 316–326, dez. 2005.
- BALAMURUGAN, A. et al. Electrochemical and structural evaluation of functionally graded bioglass-apatite composites electrophoretically deposited onto Ti6Al4V alloy. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 4, p. 1192–1198, 30 jan. 2009a.

BALAMURUGAN, A. et al. Electrochemical and structural evaluation of functionally graded bioglass-apatite composites electrophoretically deposited onto Ti6Al4V alloy. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 4, p. 1192–1198, 30 jan. 2009b.

BAPTISTA, A. M. **Correlação entre a expressão de VEGF e a sobrevida no osteossarcoma**. Doutorado em Ortopedia e Traumatologia—São Paulo: Universidade de São Paulo, 25 ago. 2010.

BARBOSA, W. A. Estudo experimental e simulado de eletrodeposição da Liga Ni-W. 28 mar. 2008.

BEERTSEN, W. et al. On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodeling, in murine molar eruption and root growth. **European Journal of Oral Sciences**, v. 110, n. 6, p. 445–451, dez. 2002.

BENENTI, G.; CASATI, G.; STRINI, G. **Principles of Quantum Computation and Information: Volume I: Basic Concepts**. [s.l.] WORLD SCIENTIFIC, 2004.

BUSALMEN, J. P.; DE SÁNCHEZ, S. R. Influence of pH and ionic strength on adhesion of a wild strain of *Pseudomonas* sp. to titanium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 303–308, 1 maio 2001.

CAMARGO, J.; MACHADO, A. USINABILIDADE DE VÁRIOS MATERIAIS COM CARACTERÍSTICAS DIFERENTES, TENDO COMO PARÂMETRO A RUGOSIDADE. 3 abr. 2015.

CASALETTO, M. P. et al. Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings. **Applied Surface Science**, v. 172, n. 1, p. 167–177, 1 mar. 2001.

CECCHINATO, D. et al. Osseointegration in periodontitis susceptible individuals. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 1, p. 1–4, 2012.

CHAVES, J. M. et al. Characterization of the structure, thermal stability and wettability of the TiO₂ nanotubes growth on the Ti–7.5Mo alloy surface. **Applied Surface Science**, v. 370, p. 76–82, 1 maio 2016.

CHEN, K.-T. et al. Effects of Micro-Arc Oxidation Discharge Parameters on Formation and Biomedical Properties of Hydroxyapatite-Containing Flower-like Structure Coatings. **Materials**, v. 16, n. 1, p. 57, jan. 2023.

CHEN, W. et al. Surface functionalization of titanium implants with chitosan-catechol conjugate for suppression of ROS-induced cells damage and improvement of osteogenesis. **Biomaterials**, v. 114, p. 82–96, 1 jan. 2017.

CHETTY, A. et al. Synthesis, properties, and applications of hydroxyapatite. Em: [s.l.] Nova Science Publishers, 2012.

CHO, K. S. et al. A novel etchant for revealing the prior austenite grain boundaries and matrix information in high alloy steels. **Materials Characterization**, v. 59, n. 6, p. 786–793, 1 jun. 2008.

CHOI, A. H.; KARACAN, I.; BEN-NISSAN, B. Surface modifications of titanium alloy using nanobioceramic-based coatings to improve osseointegration: a review. **Materials Technology**, v. 35, n. 11–12, p. 742–751, 14 out. 2020.

COELHO, P. G. et al. Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100A, n. 7, p. 1901–1906, 2012.

CONDEELIS, J. How is actin polymerization nucleated in vivo? **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 7, p. 288–293, 1 jul. 2001.

CORDEIRO, J. M.; BARÃO, V. A. R. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 1201–1215, 1 fev. 2017.

COTRIM, P. et al. Expressão e atividade da metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2) durante o desenvolvimento do germe dental do primeiro molar de ratos. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, p. 97–102, 2002.

COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer—Trials and Tribulations. **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2387–2392, 29 mar. 2002.

CUNHA, V. S. et al. Estudo histomorfométrico comparativo de implantes hidrofóbicos e hidrofílicos. **Brazilian Oral Research**, v. 29, p. 483, 2015.

CURRAN, J. A.; CLYNE, T. W. Porosity in plasma electrolytic oxide coatings. **Acta Materialia**, v. 54, n. 7, p. 1985–1993, 1 abr. 2006.

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Titanium-enriched medium drives low profile of ECM remodeling as a pre-requisite to pre-osteoblast viability and proliferative phenotype. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 339–346, 1 dez. 2018.

DALLABRIDA, A. L. et al. Caracterização de biocerâmica de fosfatos de cálcio microestruturada em diferentes composições em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1327–1336, jul. 2018.

DE LA CERDA, C. et al. Processo de modificação de superfície de titânio, implantes e componentes protéticos modificados e uso dos mesmos. 4 fev. 2020.

DEGHANI FIROOZABADI, F.; RAMAZANI SAADATABADI, A.; ASEFNEJAD, A. Improving cell proliferation using polylactic acid, polycaprolactone, hydroxyapatite and zinc oxide nanocomposite for cancellous bone substitutes. **Polymer-Plastics Technology and Materials**, v. 63, n. 2, p. 95–119, 22 jan. 2024.

DHAVALIKAR, P. et al. Review of Integrin-Targeting Biomaterials in Tissue Engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 23, p. 2000795, 2020.

DONATO, T. A. G. **Estudo da influência do fator de transformação de crescimento - Beta 1 (TGF- β 1) em cultura de células osteogênicas induzidas com fatores mineralizantes.** text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 16 out. 2009.

DOS SANTOS, M. L. et al. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Ecletica Química**, v. 30, n. 3, p. 29–35, 26 set. 2005.

DOU, C. et al. Graphene-Based MicroRNA Transfection Blocks Preosteoclast Fusion to Increase Bone Formation and Vascularization. **Advanced Science**, v. 5, n. 2, p. 1700578, 2018.

DUARTE, L. DA C. et al. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas exemplos brasileiros. 2003.

ELIAS, C. N. et al. Mechanical properties, surface morphology and stability of a modified commercially pure high strength titanium alloy for dental implants. **Dental Materials**, v. 31, n. 2, p. e1–e13, 1 fev. 2015.

ELIAZ, N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. E407, 28 jan. 2019.

ERFANIFAR, E. et al. Growth kinetics and morphology of plasma electrolytic oxidation coating on aluminum. **Materials Chemistry and Physics**, v. 185, p. 162–175, 1 jan. 2017.

ESEN, E.; LONG, F. Aerobic Glycolysis in Osteoblasts. **Current Osteoporosis Reports**, v. 12, n. 4, p. 433–438, 1 dez. 2014.

EVANS, I. R. et al. Variable temperature in situ X-ray diffraction study of mechanically activated synthesis of calcium titanate, CaTiO_3 . **Materials Research Bulletin**, v. 38, n. 7, p. 1203–1213, 19 jun. 2003.

FAHRBACH, M. et al. Calibrating a high-speed contact-resonance profilometer. **Journal of Sensors and Sensor Systems**, v. 9, n. 2, p. 179–187, 7 jul. 2020.

FAIS, L. M. G. et al. Microbial Adhesion and Biofilm Formation on Bioactive Surfaces of Ti-35Nb-7Zr-5Ta Alloy Created by Anodization. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2154, out. 2021.

FALSETTI, P. H. E.; MELO, E. B. DE. Uma adaptação de síntese pelo método pechini para obtenção do CaTiO_3 / An adaptation of pechini method for CaTiO_3 synthesis. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 3, p. 2458–2461, 13 fev. 2019.

FARZADI, A. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation. **Ceramics International**, v. 37, n. 1, p. 65–71, 1 jan. 2011.

FAZEL, M. et al. Osteogenic and antibacterial surfaces on additively manufactured porous Ti-6Al-4V implants: Combining silver nanoparticles with hydrothermally synthesized HA nanocrystals. **Materials Science and Engineering: C**, v. 120, p. 111745, 1 jan. 2021.

FERRARIS, S. et al. Multifunctional commercially pure titanium for the improvement of bone integration: Multiscale topography, wettability, corrosion resistance and biological functionalization. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 384–393, 1 mar. 2016.

FILANTI, C. et al. The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. **Journal of Bone and Mineral Research: The**

Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research, v. 15, n. 11, p. 2154–2168, nov. 2000.

FREITAS et al. **Implementação de sistema para sonificação de microscopia de varredura por sonda**. Dissertação (Mestrado Engenharia Elétrica)—João Pessoa, Paraíba, Brasil: Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

FU, J.; LI, F. A forefinger-like tactile sensor for elasticity sensing based on piezoelectric cantilevers. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 234, p. 351–358, 1 out. 2015.

FU, T. et al. Sol–gel titania coating on NiTi alloy with a porous titania film as interlayer. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 307–311, 1 abr. 2011.

GHARIBI, A. et al. ITGA1 is a pre-malignant biomarker that promotes therapy resistance and metastatic potential in pancreatic cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10060, 30 ago. 2017.

GITTENS, R. A. et al. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 6268–6277, 1 abr. 2013.

GONÇALVES, C. P. Síntese e caracterização da hidroxiapatita pelo método de precipitação por via úmida com reações de ácido-base. **1 CD-ROM**, 16 jun. 2021.

GORDON, J. A. R. et al. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. **Bone**, v. 41, n. 3, p. 462–473, 1 set. 2007.

HACIOGLU, T. et al. Preparation and characteristics of co-doped hydroxyapatite biomimetic coatings on pretreated ti6al4v alloy. **Surface Review and Letters**, v. 27, n. 11, p. 2050012, nov. 2020.

HAN, Y. et al. UV-enhanced bioactivity and cell response of micro-arc oxidized titania coatings. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1518–1529, 1 set. 2008.

HAN, Y.; HONG, S.-H.; XU, K. Structure and in vitro bioactivity of titania-based films by micro-arc oxidation. **Surface and Coatings Technology**, v. 168, n. 2, p. 249–258, 22 maio 2003.

HEIMANN, R. B.; ROBERT. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. **Surface and Coatings Technology**, p. 27–38, out. 2013.

HERRMANN, P. S. P. et al. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros**, v. 7, p. 51–61, dez. 1997.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences**, v. 362, n. 1825, p. 2821–2850, 15 dez. 2004.

HSU, H.-C. et al. Characterization of Hydroxyapatite/Chitosan Composite Coating Obtained from Crab Shells on Low-Modulus Ti–25Nb–8Sn Alloy through Hydrothermal Treatment. **Coatings**, v. 13, n. 2, p. 228, fev. 2023.

ICHIKAWA, R. U. et al. Combining X-Ray Whole Powder Pattern Modeling, Rietveld and Pair Distribution Function Analyses as a Novel Bulk Approach to Study Interfaces in Heteronanostructures: Oxidation Front in FeO/Fe₃O₄ Core/Shell Nanoparticles as a Case Study. **Small**, v. 14, n. 30, p. 1800804, 2018.

INOUE, M. et al. Effect of a New Titanium Coating Material (CaTiO₃-aC) Prepared by Thermal Decomposition Method on Osteoblastic Cell Response. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 24, n. 7, p. 657–672, 1 mar. 2010.

ISHIZAWA, H.; OGINO, M. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 29, n. 1, p. 65–72, 1995.

JR, W. D. C.; RETHWISCH, D. G. **Fundamentals of Materials Science and Engineering: An Integrated Approach**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2020.

JÚNIOR, G. A. S. **Desenvolvimento de um novo eletrólito polimérico baseado num derivado de PEO e metais de transição para aplicação em dispositivos fotoeletroquímicos**. [s.l.] [s.n.], 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/926299>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

KHAN, M. R. et al. The enhanced modulation of key bone matrix components by modified Titanium implant surfaces. **Bone**, v. 50, n. 1, p. 1–8, jan. 2012.

KIM, H.-W.; KIM, H.-E.; KNOWLES, J. C. Improvement of Hydroxyapatite Sol–Gel Coating on Titanium with Ammonium Hydroxide Addition. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 88, n. 1, p. 154–159, 2005.

KOMORI, T. Runx2, A multifunctional transcription factor in skeletal development. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 1–8, 2002.

KOSTELAC, L. et al. Black PEO Coatings on Titanium and Titanium Alloys Produced at Low Current Densities. **Applied Sciences**, v. 13, n. 22, p. 12280, jan. 2023.

KUNST, S. R. et al. Influence of simulated body fluid (normal and inflammatory) on corrosion resistance of anodized titanium. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e122101018606–e122101018606, 7 ago. 2021.

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 α . **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1094, n. 1, p. 8–18, ago. 1991.

LEHMANN, T. P. et al. Gene Expression in MC3T3-E1 Cells Treated with Diclofenac and Methylprednisolone. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 184, jan. 2023.

LETIĆ-GAVRILOVIĆ, A.; SCANDURRA, R.; ABE, K. Genetic Potential of Interfacial Guided Osteogenesis in Implant Devices. **Dental Materials Journal**, v. 19, n. 2, p. 99–132, 2000.

LI, H. et al. Hydrophilicity and photocatalysis of Ti_{1-x}V_xO₂ films prepared by sol–gel method. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 18, p. 7615–7618, 25 jun. 2007.

LI, Q. L. et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. **Cell**, v. 109, n. 1, p. 113–124, 5 abr. 2002.

LI, S. et al. Surface characteristics and biocompatibility of sandblasted and acid-etched titanium surface modified by ultraviolet irradiation: An in vitro study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100B, n. 6, p. 1587–1598, 2012.

LIU, S.-C.; CHEN, S.-Y. Transformation mechanism of different chemically precipitated apatitic precursors into β -tricalcium phosphate upon calcination. **Biomaterials**, v. 23, n. 23, p. 4541–4547, 1 dez. 2002.

LIU, A. P.; CHAUDHURI, O.; PAREKH, S. H. New advances in probing cell–extracellular matrix interactions. **Integrative Biology**, v. 9, n. 5, p. 383–405, 1 maio 2017.

LIU, D.-M. et al. Structural evolution of sol–gel-derived hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 23, n. 7, p. 1679–1687, 1 abr. 2002.

LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 47, n. 3, p. 49–121, 24 dez. 2004.

LLOVET, X. et al. Reprint of: Electron probe microanalysis: A review of recent developments and applications in materials science and engineering. **Progress in Materials Science**, v. 120, p. 100818, 1 jul. 2021.

MARTIM, J. G. [UNESP. Modificação de superfície da liga Ti6Al4V para aplicação biomédica. **Aleph**, p. 125 f. : il., 24 maio 2013.

MCCAFFERTY, E. Validation of corrosion rates measured by the Tafel extrapolation method. **Corrosion Science**, A Century of Tafel's Equation: A Commemorative Issue of Corrosion Science. v. 47, n. 12, p. 3202–3215, 1 dez. 2005.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 534–540, 1 out. 2001.

MENDONÇA, G. et al. Efeito de superfícies de implantes nano-estruturadas na expressão de genes de osteoblastos e no contato osso-implante in vivo. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 19, n. 50, 14 out. 2010.

METIKOŠ-HUKOVIĆ, M.; BABIĆ, R. Passivation and corrosion behaviours of cobalt and cobalt–chromium–molybdenum alloy. **Corrosion Science**, v. 49, p. 3570–3579, 1 set. 2007.

MIAO, J. et al. Extending X-Ray Crystallography to Allow the Imaging of Noncrystalline Materials, Cells, and Single Protein Complexes. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 387–410, 2008.

MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. **Current Opinion in Cell Biology**, Cell-to-cell contact and extracellular matrix. v. 18, n. 5, p. 516–523, 1 out. 2006.

MIZUTANI, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases during ascorbate-induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Journal of Bone and Mineral Research: The**

Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research, v. 16, n. 11, p. 2043–2049, nov. 2001.

MORALES, L. F. G.; HINRICHS, R.; FERNANDES, L. A. D. A técnica de difração de elétrons retro-espalhados (EBSD) em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e sua aplicação no estudo de rochas deformadas. 2007.

MOREJÓN-ALONSO, L. et al. Accelerated biomimetic nanosized apatite coatings deposition on alkali treated titanium. **Journal of Materials Research**, v. 37, n. 23, p. 4200–4210, 1 dez. 2022.

MYSHKIN, N. K. et al. Surface roughness and texture analysis in microscale. **Wear**, Papers presented at the 3rd International Colloquium Micro-tribology 2001. v. 254, n. 10, p. 1001–1009, 1 jul. 2003.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562–573, 15 fev. 2006.

NAKAJIMA, A. Design of hydrophobic surfaces for liquid droplet control. **NPG Asia Materials**, v. 3, n. 5, p. 49–56, maio 2011.

NASKAR, D. et al. Dual growth factor loaded nonmulberry silk fibroin/carbon nanofiber composite 3D scaffolds for in vitro and in vivo bone regeneration. **Biomaterials**, v. 136, p. 67–85, 1 ago. 2017.

NILEN, R. W. N.; RICHTER, P. W. The thermal stability of hydroxyapatite in biphasic calcium phosphate ceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 4, p. 1693–1702, 1 abr. 2008.

NIU, B. et al. Preparation and characterization of HA sol–gel coating on MAO coated AZ31 alloy. **Surface and Coatings Technology**, v. 286, 1 dez. 2015.

NIU, B. et al. Preparation and characterization of HA sol–gel coating on MAO coated AZ31 alloy. **Surface and Coatings Technology**, v. 286, p. 42–48, 25 jan. 2016a.

NIU, B. et al. Preparation and characterization of HA sol–gel coating on MAO coated AZ31 alloy. **Surface and Coatings Technology**, v. 286, p. 42–48, 25 jan. 2016b.

NOVASKI, O. **Introdução à Engenharia de Fabricação Mecânica**. [s.l.] Editora Blucher, 2021.

OHTSU, N. et al. CaTiO₃ coating on titanium for biomaterial application—Optimum thickness and tissue response. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 82A, n. 2, p. 304–315, 2007a.

OHTSU, N. et al. Characterization of calcium titanate thin films deposited on titanium with reactive sputtering and pulsed laser depositions. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 18, p. 7686–7691, 25 jun. 2007b.

OHTSU, N. et al. Calcium-hydroxide slurry processing for bioactive calcium-titanate coating on titanium. **Surface and Coatings Technology**, v. 202, n. 21, p. 5110–5115, 30 jul. 2008.

OLIVEIRA, A. et al. Characterization of titanium coatings on substrate of PEEK, poly (ether-ether-ketone), applied through thermal spray process for implant applications. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 34, n. 2, p. 66, 21 jun. 2015a.

OLIVEIRA, F. G. et al. Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO₂ anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium. **Applied Surface Science**, v. 341, p. 1–12, 30 jun. 2015b.

OLIVEIRA, N. C. Microscopia eletrônica de varredura de campo amplo e mapeamento elementar de raios-X de fósseis do período cretáceo. 2015.

OMAR, N. F. et al. MT1-MMP expression in the odontogenic region of rat incisors undergoing interrupted eruption. **Journal of Molecular Histology**, v. 42, n. 6, p. 505–511, dez. 2011.

OOI, L. **Principles of X-ray Crystallography**. [s.l.] OUP Oxford, 2010.

OSHIDA, Y. et al. Dental Implant Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1580–1678, 12 abr. 2010.

OTHMAN, R. et al. Effect of Calcination Temperatures on Phase Transformation and Stability of β -Tricalcium Phosphate Powder Synthesized by a Wet Precipitation Method. **Solid State Phenomena**, v. 264, p. 132–135, 2017.

OUM'HAMED, Z. et al. Matrix metalloproteinases MMP-2, -9 and tissue inhibitors TIMP-1, -2 expression and secretion by primary human osteoblast cells in response to titanium, zirconia, and alumina ceramics. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 68A, n. 1, p. 114–122, 2004.

PARADELLA, T. C.; BOTTINO, M. A. Scanning Electron Microscopy in modern dentistry research. **Brazilian Dental Science**, v. 15, n. 2, p. 43–48, 31 out. 2012.

PARK, E. J. et al. Structural basis of blocking integrin activation and deactivation for anti-inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 51, 8 jul. 2015.

PARRA, B. S. et al. Rugosidade Superficial de Revestimentos Cerâmicos. **Cerâmica Industrial**, p. 4, 2006.

PARSONS, J. T. et al. Focal Adhesion Kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. **Oncogene**, v. 19, n. 49, p. 5606–5613, nov. 2000.

PAWLEY, G. S. Unit-cell refinement from powder diffraction scans. **Journal of Applied Crystallography**, v. 14, n. 6, p. 357–361, 1 dez. 1981.

PIRES, A. F. Avaliação da adição da titânia aos fosfatos de cálcio nas características físicas e na resistência à compressão visando à regeneração óssea. 2023.

PONGNARISORN, N. J. et al. Inflammation associated with implants with different surface types. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, n. 1, p. 114–125, fev. 2007.

PYLYPCHUK, I. V. et al. Chapter 7 - Formation of biomimetic hydroxyapatite coatings on the surface of titanium and Ti-containing alloys: Ti–6Al–4V and Ti–Zr–Nb. Em: GRUMEZESCU,

A. M. (Ed.). **Surface Chemistry of Nanobiomaterials**. [s.l.] William Andrew Publishing, 2016. p. 193–229.

RAKNGARM, A.; MIYASHITA, Y.; MUTOH, Y. Formation of hydroxyapatite layer on bioactive Ti and Ti–6Al–4V by simple chemical technique. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 5, p. 1953–1961, 1 maio 2008a.

RAKNGARM, A.; MIYASHITA, Y.; MUTOH, Y. Formation of hydroxyapatite layer on bioactive Ti and Ti–6Al–4V by simple chemical technique. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 5, p. 1953–1961, 1 maio 2008b.

ROESSLER, S. et al. Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, n. 10–12, p. 871–877, 2001.

SAGHIRI, M. A. et al. Back-scattered and secondary electron images of scanning electron microscopy in dentistry: a new method for surface analysis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 70, n. 6, p. 603–609, dez. 2012.

SALVADOR, D. G. et al. Development of Alkoxide Precursors-Based Hybrid Coatings on Ti–6Al–4V Alloy for Biomedical Applications: Influence of pH of Sol. **Journal of Materials Engineering and Performance**, v. 27, n. 6, p. 2863–2874, 1 jun. 2018.

SCHENK, R. K.; BUSER, D. Osseointegration: a reality. **Periodontology 2000**, v. 17, n. 1, p. 22–35, 1998.

SCISŁOWSKA-CZARNECKA, A. et al. Ceramic modifications of porous titanium: Effects on macrophage activation. **Tissue and Cell**, v. 44, n. 6, p. 391–400, 1 dez. 2012.

SEBÉ PEDRÓS, A. Origen de la multicel·lularitat : una aproximació genòmica i funcional. 17 jan. 2011.

SEKARAN, S.; VIMALRAJ, S.; THANGAVELU, L. The Physiological and Pathological Role of Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase beyond Mineralization. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1564, nov. 2021.

SHIBATA, Y. et al. The characteristics of in vitro biological activity of titanium surfaces anodically oxidized in chloride solutions. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8546–8555, 1 nov. 2010.

SHIN, D. H. et al. Wettability changes of TiO₂ nanotube surfaces. **Nanotechnology**, v. 22, n. 31, p. 315704, 5 ago. 2011.

SHUBAYEV, V. I. et al. Titanium implants induce expression of matrix metalloproteinases in bone during osseointegration. **The Journal of Rehabilitation Research and Development**, v. 41, n. 6, p. 757, 2004.

SILVA, C. M. O. et al. Benefícios da condroitinase abc associada a células-tronco mesenquimais na lesão espinhal aguda em ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 857–872, jun. 2018.

SILVA, M. A. M. DA. **Caracterização de superfícies de titânio modificado por oxidação à plasma**. doctoralThesis—[s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 8 out. 2013.

SIMKA, W. et al. Modification of a Ti–Mo alloy surface via plasma electrolytic oxidation in a solution containing calcium and phosphorus. **Electrochimica Acta**, v. 96, p. 180–190, abr. 2013a.

SIMKA, W. et al. Anodic oxidation of zirconium in silicate solutions. **Electrochimica Acta**, v. 104, p. 518–525, 1 ago. 2013b.

SINGH, S.; SINGH, M. Explosives detection systems (EDS) for aviation security. **Signal Processing**, v. 83, n. 1, p. 31–55, 1 jan. 2003.

SONG, W. H. et al. Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3341–3349, 2004a.

SONG, W.-H. et al. Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3341–3349, ago. 2004b.

SONG, W.-H. et al. Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3341–3349, 1 ago. 2004c.

SOUSA, S. J. G.; HOLANDA, J. N. F. Avaliação das propriedades físico-mecânicas de uma massa cerâmica para revestimento poroso (BIII). **Cerâmica**, v. 51, p. 70–76, mar. 2005.

SPLENDRE, A. Para que existem as regras de nomenclatura genética? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, p. 148–152, jun. 2005.

STANISHEVSKY, A. V.; HOLLIDAY, S. Mechanical properties of sol–gel calcium titanate bioceramic coatings on titanium. **Surface and Coatings Technology**, v. 202, n. 4–7, p. 1236–1241, dez. 2007.

STETLER-STEVENSON, W. G. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Cell Signaling: Metalloproteinase-Independent Biological Activities. **Science Signaling**, v. 1, n. 27, p. re6–re6, 8 jul. 2008.

SULTANA, R.; YANG, J.; HU, X. Deposition of Micro-Porous Hydroxyapatite/Tri-Calcium Phosphate Coating on Zirconia-Based Substrate. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 95, n. 4, p. 1212–1215, 2012.

SUN, J.; HAN, Y.; CUI, K. Innovative fabrication of porous titanium coating on titanium by cold spraying and vacuum sintering. **Materials Letters**, v. 62, n. 21, p. 3623–3625, 15 ago. 2008.

TAKAHASHI, K.; FUKUZAKI, S. Cleanability of Titanium and Stainless Steel Particles in Relation to Surface Charge Aspects. **Biocontrol Science**, v. 13, n. 1, p. 9–16, 2008.

TAN, W. L.; MCNEILL, C. R. X-ray diffraction of photovoltaic perovskites: Principles and applications. **Applied Physics Reviews**, v. 9, n. 2, p. 021310, 25 maio 2022.

TANG, H. et al. Fabrication of hydroxyapatite coatings on AZ31 Mg alloy by micro-arc oxidation coupled with sol–gel treatment. **RSC Advances**, v. 8, n. 22, p. 12368–12375, 2018.

TU, Q. et al. Haploinsufficiency of Runx2 results in bone formation decrease and different BSP expression pattern changes in two transgenic mouse models. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 1, p. 40–47, 2008.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 1–31, 1 jan. 2004.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2 maio 2003.

WANG, C. K.; JU, C. P.; CHERN LIN, J. H. Effect of doped bioactive glass on structure and properties of sintered hydroxyapatite. **Materials Chemistry and Physics**, v. 53, n. 2, p. 138–149, 1 maio 1998.

WANG, G. et al. Corrosion Behavior of Titanium Implant with different Surface Morphologies. **Procedia Manufacturing**, 45th SME North American Manufacturing Research Conference, NAMRC 45, LA, USA. v. 10, p. 363–370, 1 jan. 2017.

WEI, D. et al. Structure of calcium titanate/titania bioceramic composite coatings on titanium alloy and apatite deposition on their surfaces in a simulated body fluid. **Surface and Coatings Technology**, EUROMAT 2005. v. 201, n. 21, p. 8715–8722, 25 ago. 2007.

WHEELER, J. M. et al. Evaluation of micromechanical behaviour of plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings on Ti–6Al–4V. **Surface and Coatings Technology**, v. 204, n. 21, p. 3399–3409, 15 ago. 2010.

YU, Y. et al. Osteogenesis potential of different titania nanotubes in oxidative stress microenvironment. **Biomaterials**, v. 167, p. 44–57, 1 jun. 2018.

ZHANG, H. et al. Direct growth of hierarchically structured titanate nanotube filtration membrane for removal of waterborne pathogens. **Journal of Membrane Science**, v. 343, n. 1–2, p. 212–218, 2009.

ZHANG, X. et al. The dependence of persistent phosphorescence on annealing temperatures in CaTiO₃:Pr³⁺ nanoparticles prepared by a coprecipitation technique. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 181, n. 3, p. 393–398, 1 mar. 2008.

ZHANG, X. et al. Cell-free 3D scaffold with two-stage delivery of miRNA-26a to regenerate critical-sized bone defects. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10376, 14 jan. 2016.

ZHOU, P.; AKAO, M. Preparation and characterization of double layered coating composed of hydroxyapatite and perovskite by thermal decomposition. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 7, n. 1, p. 67–81, 1 jan. 1997.

ZHU, X. et al. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4087–4103, 1 ago. 2004.

ZHU, X.; KIM, K.-H.; JEONG, Y. Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial. **Biomaterials**, v. 22, n. 16, p. 2199–2206, 15 ago. 2001.

ZINGER, O. et al. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2695–2711, 1 jun. 2004.

ZIROS, P. G.; BASDRA, E. K.; PAPAVALASSILOU, A. G. Runx2: of bone and stretch. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 9, p. 1659–1663, 2008.

7 APÊNDICE

A1. Difractometria de Raios X

A difração de raios X é um fenômeno que ocorre quando os raios X interagem com uma estrutura cristalina. Essa interação resulta na dispersão dos raios X em diferentes direções, devido à interferência construtiva e destrutiva das ondas de raios X que incidem sobre os átomos da rede cristalina (OOI, 2010). A análise permite determinar a estrutura cristalina de materiais, revelando a disposição dos átomos em uma célula unitária e em todo o cristal. Além de contém informações valiosas sobre a estrutura atômica do cristal, incluindo a posição dos átomos e a distância entre eles.

Os raios X são uma forma de radiação eletromagnética com comprimento de onda curto, situado na faixa de 0,01 a 100 Å (angstroms). Na difração de raios X, geralmente são usados comprimentos de onda entre 0,5 e 2,5 Å, que são particularmente adequados para estudos cristalográficos (MIAO et al., 2008). O comprimento de onda dos raios X é significativamente menor do que a distância entre os átomos em um cristal, o que permite que os raios X interajam com a estrutura cristalina.

A teoria pode ser explicada de acordo com a lei da difração de Bragg, a difração construtiva ocorre quando a diferença de percurso óptico entre os raios X refletidos por dois planos de rede adjacentes é igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda dos raios X (TAN; MCNEILL, 2022). Matematicamente, isso é expresso pela equação:

$$n\lambda = 2d \sin(\theta)$$

onde n é a ordem do pico de difração, λ é o comprimento de onda dos raios X, d é a distância entre os planos de rede e θ é o ângulo de incidência dos raios X.

A partir dessa equação, é possível determinar a distância entre os planos de rede (d) conhecendo o ângulo de difração (θ) e o comprimento de onda dos raios X. A análise de múltiplos ângulos de difração permite obter informações sobre a estrutura tridimensional do cristal.

A2. Refinamento de Pawley

O método de Pawley, também conhecido como Whole Powder Pattern Fitting (WPPF), é um método de ajuste total do padrão de difração de pó que permite determinar parâmetros estruturais e de alargamento dos picos sem a necessidade de um modelo estrutural prévio. Nesse

método, as intensidades dos picos de difração são tratadas como parâmetros ajustáveis (ICHIKAWA et al., 2018).

A teoria por trás do método de Pawley baseia-se na decomposição dos perfis de difração de pó dispersivo em ângulo. O objetivo é ajustar os parâmetros de forma a reproduzir o perfil de difração experimental o mais próximo possível. Isso é feito por meio de um procedimento de minimização de mínimos quadrados, em que a diferença entre o perfil experimental e o perfil calculado com os parâmetros ajustados é minimizada (BAIL, 2005) (ICHIKAWA et al., 2018).

Diante disso, propôs que o perfil de difração pode ser ajustado considerando os seguintes parâmetros:

1. Intensidade de cada reflexão (hkl): Cada pico de difração possui uma intensidade associada, que representa a quantidade de difração ocorrendo nessa reflexão específica.
2. Parâmetros da cela unitária (a, b, c, α , β , γ): Esses parâmetros descrevem a geometria da cela unitária da estrutura cristalina. Eles definem as dimensões e ângulos entre os vetores que descrevem a célula unitária.
3. Erro na posição 2θ : O parâmetro $2\theta_0$ representa o erro na posição angular do pico de difração devido a imprecisões instrumentais. Pawley considerou esse parâmetro para levar em conta possíveis erros experimentais.
4. Parâmetros de alargamento dos picos (U, V, W): Esses parâmetros descrevem a forma e a largura dos picos de difração no perfil. Eles estão relacionados à função de resolução do instrumento e afetam a forma como os picos são observados no padrão de difração.
5. Outros parâmetros de forma do pico (η , etc.): Além dos parâmetros de alargamento, podem ser considerados outros parâmetros que afetam a forma do pico, como assimetria ou efeitos de deformação.

A intensidade teórica é calculada através da seguinte equação:

$$I(2\theta_i)_{\text{calc}} = b(2\theta_i) + \sum_j I_j P(2\theta_i - 2\theta_j)_j$$

onde $b(2\theta_i)$ é a intensidade do *background*, I_j é a intensidade integrada da j -ésima reflexão, $2\theta_j$ é a posição de máxima intensidade do pico, $P(2\theta_i)_j$ é a função de perfil e a soma é realizada sobre as reflexões vizinhas, que dá a contribuição em $2\theta_i$.

É importante ressaltar que o método de Pawley possui algumas limitações. Uma delas é a correlação entre as intensidades dos picos de difração quando estão muito próximos ou sobrepostos no perfil. Essa correlação pode levar a resultados instáveis e matrizes de mínimos quadrados singulares. Para contornar esse problema, Pawley introduziu restrições no procedimento de refinamento para evitar intensidades negativas e reduzir as correlações (BAIL,

2005). Além disso, o método é particularmente útil quando a disponibilidade de cristais únicos adequados para a análise é limitada, permitindo a caracterização de estruturas a partir de padrões de difração de pó, possibilitando refinamentos mais precisos e eficientes da estrutura cristalina.

A3. Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de imagem que utiliza um feixe de elétrons para analisar amostras em alta resolução.

A teoria física por trás da MEV baseia-se nas propriedades dos elétrons que são gerados por um canhão eletrônico, normalmente utilizando um filamento de cobre (Cu) ou hexaboreto de lantânio (LaB₆) (SAGHIRI et al., 2012). Esses elétrons são acelerados por uma diferença de potencial e, em seguida, focalizados por lentes condensadoras e objetivas magnéticas. O diâmetro do feixe de elétrons, conhecido como "spot size", pode ser controlado pela corrente que passa pelas lentes condensadoras e pela abertura. Quanto menor o spot size, melhor será a resolução da imagem obtida (PARADELLA; BOTTINO, 2012).

Quando o feixe de elétrons atinge a amostra, ocorrem várias interações que fornecem informações valiosas. Os elétrons podem ser retroespalhados após colisões elásticas com a amostra, mudando apenas sua direção original (MORALES; HINRICHS; FERNANDES, 2007). Esses elétrons retroespalhados são usados para obter imagens de contraste, uma vez que sua intensidade está relacionada ao ângulo de incidência e também é afetada pela composição, cristalografia e propriedades magnéticas da amostra (SAGHIRI et al., 2012). Além dos elétrons retroespalhados, colisões inelásticas podem levar à emissão de elétrons secundários, que são originados pela interação do feixe de elétrons com elétrons orbitais da amostra. Esses elétrons secundários são úteis para a obtenção de imagens topográficas, pois estão próximos à superfície da amostra. A colisão inelástica também pode resultar na emissão de radiação, como raios X e espectro visível (OLIVEIRA, 2015).

A interação do feixe de elétrons com a amostra também pode levar à produção de raios X característicos. Quando o feixe de elétrons interage com elétrons próximos ao núcleo atômico, esses elétrons podem ser ejetados, deixando um buraco que é preenchido por um elétron de nível superior. Esse processo resulta na emissão de energia na forma de raios X característicos do material, que podem ser utilizados para determinar a composição elementar da amostra (FERNANDES, 2017). Além disso, é possível obter mapas elementares da amostra com base nessa interação.

Para obter mapas elementares que traz informações precisas sobre a composição elementar em uma escala microscópica, usa-se a Espectrometria de Dispersão de Energia (EDS) é uma técnica utilizada em conjunto com a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a detecção e análise de elementos químicos presentes em amostras. Ela desempenha um papel importante na caracterização e quantificação da composição elementar de diversos materiais (DUARTE et al., 2003).

A teoria física por trás da EDS baseia-se na interação dos raios X característicos emitidos pela amostra com um detector. Quando o feixe de elétrons interage com a amostra, ocorrem colisões inelásticas que resultam na emissão de raios X característicos de diferentes elementos presentes na amostra. O detector de EDS é capaz de medir a energia desses raios X e converter essa informação em sinais elétricos que podem ser analisados (LLOVET et al., 2021). A detecção de elementos na EDS está relacionada ao número atômico (Z), sendo capaz de detectar elementos com Z maior que 4. Para elementos com Z acima de 11, pode detectar concentrações mínimas de cerca de 0,02% em peso, desde que apresentem contagem de raios-X suficiente e picos isolados. A quantificação é feita com base na contagem e intensidade dos picos de raios X, comparando-se com padrões de referência. A correção dos dados é realizada pelo método ZAF, considerando absorção dos raios X, número atômico e correções de fluorescência (SINGH; SINGH, 2003).

A4. Perfilometria de contato

A perfilometria de contato é uma técnica usada para medir a altura e as características topográficas de uma superfície através do contato direto de uma ponta de sensor com a amostra em análise. A teoria da perfilometria de contato envolve o uso de um cantilever de silício com uma ponta na extremidade livre e uma ponte de Wheatstone próxima ao ponto de ancoragem. O cantilever de silício é uma estrutura fina e flexível que se curva quando uma força é aplicada à sua ponta. A deformação no cantilever é proporcional à deflexão da ponta, ou seja, à mudança na posição vertical da ponta em relação à posição de equilíbrio. A ponte de Wheatstone é um circuito elétrico que consiste em quatro piezoresistores implantados no cantilever perto de sua extremidade fixada (FU; LI, 2015).

Quando a ponta do sensor entra em contato com a superfície da amostra, ocorre uma deformação no cantilever devido à interação entre a ponta e a superfície. Essa deformação resulta em uma mudança na resistência dos piezoresistores na ponte de Wheatstone. Como consequência, uma tensão de saída é gerada pela ponte, e essa tensão é proporcional à deflexão

do cantilever, que, por sua vez, está relacionada à altura da superfície da amostra. Ao escanear a ponta do sensor na superfície da amostra, a tensão de saída do sensor pode ser registrada em diferentes pontos, permitindo assim a reconstrução do perfil de altura da superfície. Em baixas frequências, o comportamento dependente do tempo pode ser negligenciado, e a relação entre a tensão de saída do sensor e a deflexão do cantilever é linear, simplificando a interpretação dos dados (FAHRBACH et al., 2020).

A rugosidade da superfície é quantificada em termos da amplitude de perfil (R_a e R_q). A teoria por trás desses cálculos envolve o processamento dos dados obtidos a partir da medição do perfil de altura da superfície.

Para calcular a rugosidade R_a , é necessário seguir alguns passos. Primeiro, obtém-se o perfil de altura da superfície medido pelo sensor de perfilometria de contato. Em seguida, subtrai-se o valor médio desse perfil ao longo de toda a extensão da superfície para remover qualquer componente de inclinação ou desvio sistemático. Essa etapa envolve o cálculo da média dos valores do perfil e a subtração desse valor de cada ponto do perfil. Posteriormente, calcula-se o valor absoluto de cada desvio em relação à linha média para garantir que todos os valores sejam positivos. Por fim, realiza-se a média aritmética dos desvios absolutos, resultando na rugosidade R_a , que representa uma medida média da rugosidade da superfície (PARRA et al., 2006). No entanto, esse parâmetro apresenta fator limitante por ser um valor médio de amplitude do perfil: diverge quanto as alturas das ondulações, além do risco de apresentar erros em níveis inaceitáveis, por vezes, por não distinguir os picos e dos vales do perfil.

A norma Brasileira NBR 8404/1984 apresenta parâmetros de rugosidade alternativo. A rugosidade média quadrática (R_q), conhecida também como RMS (do inglês, *Root Mean Square*), segue um processo ligeiramente diferente. Primeiro, obtém-se o perfil de altura da superfície medido pelo sensor de perfilometria de contato. Novamente, subtrai-se o valor médio do perfil de altura para eliminar qualquer componente de inclinação ou desvio sistemático. Em seguida, calcula-se o quadrado de cada desvio em relação à linha média. (HERRMANN et al., 1997) Por fim, realiza-se a média aritmética dos quadrados dos desvios, resultando na rugosidade R_q , que representa a dispersão quadrática da rugosidade da superfície (PARRA et al., 2006).

Portanto, a comparação entre R_a e R_q pode revelar informações sobre a natureza das irregularidades em uma superfície. Se houver uma diferença substancial entre esses valores, indica-se que a superfície possui características irregulares mais pronunciadas, enquanto valores semelhantes indicam uma rugosidade mais uniforme ao longo do perfil medido. Essa

comparação adicional pode auxiliar na interpretação e na caracterização mais completa da rugosidade da superfície.

A5. Microscopia de Força Atômica

O princípio de funcionamento do microscópio de varredura por força (AFM) é baseado na medição das forças de atração ou repulsão entre a superfície da amostra e uma sonda fina chamada ponteira. O AFM utiliza um sistema piezoelétrico para realizar a varredura da amostra nas posições x, y e z com alta precisão. Esse sistema permite varrer a amostra em três dimensões e obter imagens topográficas e medidas de força com alta resolução. O AFM possui um cantiléver, que é uma haste com baixa constante de mola, na qual a ponteira é fixada. A ponteira mapeia a amostra enquanto o cantiléver mede a força de interação entre a amostra e a ponteira. A deflexão do cantiléver causada pela interação é medida usando um sistema ótico com um feixe de laser e um fotodetector. Essa deflexão é utilizada para reconstruir a imagem da topografia da amostra por meio de software dedicado (HERRMANN et al., 1997).

A interação local entre a ponteira acoplada em uma haste flexível “cantilever” na superfície de uma amostra, quantifica de forma direta a rugosidade média (microestrutura dos materiais) da superfície. À medida que a ponteira varre uma amostra, geram forças interatômicas de atração (tipo de forças de Van der Waals) e repulsão coulombiana. Com deslocamento da ponteira sobre a superfície da amostra, é produzida uma deflexão da haste, que é medida por métodos óticos, mais especificamente por um feixe de laser, que reflete especularmente na parte de trás da haste e cai sobre um fotodetector. Ao medir a posição do feixe refletido em cada quadrante, os deslocamentos da ponta na direção z podem ser determinados. Em um microscópio operando sob modo *tapping*, a ponteira oscila sobre a superfície da amostra, tocando-a periodicamente, porém a movimentação é realizada com a ponteira no ar e, por isso, as forças de atrito entre a ponteira e amostra é reduzida, minimizando a deformação da amostra que ocorreria no modo de contato (FREITAS et al., 2018).

Imagens do AFM de diferentes superfícies são usadas como dados qualitativos. Para quantificação, o comprimento varrido, o escalonamento dimensional e material da ponteira que estão em nível de nanoescala, difere-se do perfil encontrado pelo perfilômetro mecânico, o que traz divergência nos perfis ondulatórios capturados (MYSHKIN et al., 2003) . No entanto, há correlação na captura dos parâmetros, de rugosidade média (R_a) e rugosidade média quadrática (R_q).

A6. Molhabilidade, ângulo de contato e energia de superfície

A teoria da molhabilidade e energia de superfície está relacionada às propriedades de interação entre um líquido e uma superfície sólida. A capacidade de molhar um material refere-se à habilidade do líquido em espalhar-se sobre a superfície ou formar uma gota sobre ela.

As forças de atração que atuam nas interfaces sólido-vapor, líquido-vapor e sólido-líquido de uma superfície desempenham um papel fundamental na molhabilidade. Essas forças são governadas pelas forças coesivas que causam a tensão superficial do líquido, ou seja, a tendência das moléculas de um líquido em se manterem unidas.

Pelo ângulo de contato com uma gota de água (altamente polar) avalia-se a hidrofilicidade e/ou hidrofobicidade da superfície. A literatura cita que ângulo de contato entre 0° e 90° representa superfícies com alta molhabilidade, e considera a superfície hidrofílica. Quando forma ângulo maiores que 90° , é considerado que o líquido não molha a superfície sendo, portanto, hidrofóbicas (NAKAJIMA, 2011).

A relação do molhamento da superfície com as forças adesivas exercidas entre o líquido e a superfície e as forças de coesão do líquido, pode-se quantificar a energia de superfície do sólido (FERRARIS et al., 2016). A importância desse parâmetro está na absorção de proteínas e biomoléculas na superfície do biomaterial, que afeta a resposta celular. Cabe salientar que, o grau de hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície e a energia superficial requeridos dependem do tipo de célula a ser utilizada.

A escolha dos líquidos de polaridade diferente é essencial para determinar a energia superficial do material. Em geral, usa-se o diiodometano, além da água, cujos componentes apolar e dispersivo da tensão superficial são distintos dos da água.

A energia de superfície é uma medida da energia livre das superfícies que tendem a interagir com as moléculas ao seu redor. Ela está relacionada à capacidade de um líquido se espalhar sobre uma superfície sólida. A energia de superfície pode ser quantificada pelo ângulo formado entre o líquido (polar ou apolar) e a superfície de análise.

Tabela 9. Componentes da tensão de superfície dos líquidos indicadas pelo software ADVANCE.

Líquidos	(γ_L) Tensão superficial [mN/m]	(γ_L^D) Dispersiva [mN/m]	(γ_L^P) Polar [mN/m]
Água	72,3	18,7	53,3
Diiodometano	50,3	50,8	0

O modelo OWRK baseia sua teoria na aproximação de Fowkers, que relaciona o cosseno do ângulo θ de contato da superfície do substrato com os líquidos, com as componentes da tensão superficial do líquido e com as coordenadas da tensão do substrato (ver equações 1 e 2).

$$\gamma_{L(\text{água})} \cdot (1 + \cos\theta_{(\text{água})}) = 2\sqrt{\gamma_S^D} \cdot \sqrt{\gamma_{L(\text{água})}^D} + 2\sqrt{\gamma_S^P} \cdot \sqrt{\gamma_{L(\text{água})}^P} \quad (1)$$

$$\gamma_{L(\text{diiodomet})} \cdot (1 + \cos\theta_{(\text{diiodomet})}) = 2\sqrt{\gamma_S^D} \cdot \sqrt{\gamma_{L(\text{diiodomet})}^D} + 2\sqrt{\gamma_S^P} \cdot \sqrt{\gamma_{L(\text{diiodomet})}^P} \quad (2)$$

onde: γ_L é tensão superficial total do líquido; γ_L^D é componente dispersivo da tensão superficial do líquido; γ_L^P é componente polar da tensão superficial do líquido (COELHO et al., 2012). Assim, segundo modelo, a energia de superfície do sólido (γ_S) pode ser determinada como soma dos componentes dispersivo (γ_S^D) e polar (γ_S^P) do sólido, descrita na equação 1 e 2, conforme:

$$\gamma_S = \gamma_S^D + \gamma_S^P \quad (3)$$

A7. Ensaio de corrosão

O teste eletroquímico, especificamente o teste de potencial de circuito aberto (OCP) e a potenciometria, são ferramentas utilizadas na área da eletroquímica para estudar o comportamento de eletrodos e reações eletroquímicas. Essas técnicas fornecem informações sobre o potencial de equilíbrio e a taxa de reação de oxidação e redução de espécies químicas em solução.

O potencial de circuito aberto (OCP) é o potencial elétrico que se estabelece no eletrodo de trabalho quando não há passagem líquida de corrente elétrica (corrente líquida zero). Em um sistema de três eletrodos, o OCP é expresso em relação a um eletrodo de referência. Isso significa que, ao aplicar um potencial externo igual ao OCP, não haverá fluxo líquido de corrente elétrica quando o circuito for fechado (METIKOŠ-HUKOVIĆ; BABIĆ, 2007).

A teoria do OCP está relacionada à reversibilidade das reações eletroquímicas. Considerando uma reação eletroquímica reversível genérica, na forma reduzida (R) e oxidada (O), a taxa da reação no sentido direto (oxidação) é igual à taxa no sentido inverso (redução) sob OCP. Isso implica que as reações de oxidação e redução estão ocorrendo simultaneamente no eletrodo de trabalho, sem que uma predomine sobre a outra. No entanto, se um potencial aplicado for menor que o OCP (mais catódico), a taxa da reação de redução será maior que a taxa da reação de oxidação, resultando em uma corrente líquida de redução. Da mesma forma, se o potencial for maior que o OCP (mais anódico), a taxa da reação de oxidação será maior que a taxa da reação de redução, resultando em uma corrente líquida de oxidação (WANG et al., 2017).

A relação entre o potencial aplicado e a densidade de corrente é descrita pela equação de Butler-Volmer, que leva em consideração a densidade de corrente de troca (i_0), o coeficiente

de transferência (α), o sobrepotencial ($h = E - E_{eq}$) e o potencial de equilíbrio (E_{eq}). Essa equação relaciona a velocidade da reação eletroquímica com o potencial aplicado.

O potencial de circuito aberto (OCP) depende das espécies químicas presentes na superfície do eletrodo e de suas concentrações. A relação entre a concentração das espécies e o potencial de equilíbrio é dada pela equação de Nernst. Essa equação relaciona o potencial de equilíbrio (E_{eq}) com a concentração das espécies químicas envolvidas na reação, a temperatura (T), o número de elétrons envolvidos na reação (z) e a constante de Faraday (F) (BARBOSA, 2008).

As equações de Tafel são expressas como logaritmos das densidades de corrente (i) em relação aos termos b_c e b_a . Os coeficientes b_c e b_a são chamados de inclinações de Tafel catódica e anódica, respectivamente. Essas inclinações fornecem informações sobre o mecanismo da reação eletroquímica. Valores diferentes de z para a inclinação podem indicar diferentes etapas envolvidas no processo de transferência de carga (MCCAFFERTY, 2005).

A resposta em corrente é registrada e um gráfico de potencial (E) ou sobrepotencial (h) versus $\log |i|$ é construído. Os valores das inclinações de Tafel são determinados selecionando-se a região linear nos ramos catódico e anódico da curva potenciodinâmica. Extrapolando as retas de Tafel e encontrando o ponto de intersecção, obtém-se os valores do potencial de corrosão (E_{corr}) e da densidade de corrente de corrosão (i_{corr}). Com base nos valores obtidos, é possível calcular a resistência à polarização (R_p) e a taxa de corrosão (C_r) usando as equações mencionadas. A taxa de corrosão é calculada considerando a lei de Faraday e assumindo uma dissolução uniforme.

$$R_p = \frac{b_a |b_c|}{2,3 i_{corr} (b_a + |b_c|)} \quad (4)$$

$$C_r = 3,27 \frac{a \cdot i_{corr}}{nD} \quad (5)$$

Na equação, b_a e b_c são os coeficientes angulares (inclinação de Tafel em V/dec) da parte linear das curvas “E versus $\log |i|$ ” dos ramos anódico e catódico, respectivamente, i_{corr} é a densidade de corrente de corrosão (A/cm^2), a é a massa atômica (47,9 g/mol para titânio), n é a mudança na valência da espécie sob corrosão ($n=4$) e D é a densidade do metal (4,51 g/cm³ para Ti c.p.). A taxa de corrosão (C_r) é calculada considerando a lei de Faraday e assumindo que a dissolução é uniforme.

A8. Ensaio Mecânico

A teoria de flexão a quatro pontos é uma abordagem utilizada para analisar o comportamento de materiais quando submetidos a um carregamento que induz flexão. Essa teoria considera um estado de flexão pura, onde todas as outras tensões, além das resultantes da flexão, são negligenciadas. O ensaio de flexão a quatro pontos é amplamente utilizado para determinar as propriedades mecânicas de materiais, como a resistência à flexão e a rigidez.

Nesse tipo de ensaio, um corpo de prova com seção transversal retangular é colocado sobre dois apoios distantes entre si, conhecidos como apoios externos, e uma carga é aplicada no centro do corpo de prova, entre os apoios. Esse carregamento concentrado cria um momento fletor que causa a flexão do corpo de prova.

A expressão que descreve o campo de tensões atuantes em um corpo de prova com seção transversal retangular submetido à flexão a quatro pontos é determinada pela teoria de flexão de vigas de Euler-Bernoulli. Essa teoria estabelece que as tensões na seção transversal variam linearmente ao longo da altura do corpo de prova, enquanto permanecem constantes ao longo da largura.

Aplicando a equação 6 e 7 é possível transformar a curva de força *versus* deslocamento em uma curva de tensão *versus* deformação, a fim de obter parâmetros como o módulo de elasticidade e tensão máxima de flexão.

$$\sigma \left(\frac{\text{N}}{\text{mm}^2} \right) = \frac{0,75 FL}{b \cdot h^2} \quad (6)$$

$$\varepsilon \left(\frac{\text{mm}}{\text{mm}^2} \right) = \frac{4,36 Dh}{L^2} \quad (7)$$

onde σ é a tensão, ε é a deformação, F é a força aplicada em todo suporte superior, L é o comprimento entre os apoios inferiores (22 mm neste caso), b é o comprimento da amostra, h é a espessura do corpo de prova (1mm, neste caso) e D é o deslocamento para a deformação da amostra (medido pelo software).