



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Bárbara Araújo dos Reis

Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga β Ti-35Nb-7Zr-5Ta caracterizada com íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e PO_3^{4-}

Araraquara

2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Bárbara Araújo dos Reis

Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga β Ti-35Nb-7Zr-5Ta caracterizada com íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e PO_3^{4-}

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Odontologia, na Área de Implantodontia.

Orientador: Dr. Luis Geraldo Vaz

Araraquara

2021

R375c Reis, Bárbara Araújo dos
Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga Ti-35Nb-7Zr- 5Ta caracterizada com íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e PO_3^{4-} / Bárbara Araújo dos Reis. -- Araraquara, 2021
69 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Luis Geraldo Vaz

1. Biofilmes. 2. Titânio. 3. Ligas. 4. Biologia celular. 5. Osseointegração. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Bárbara Araújo dos Reis

Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga β Ti-35Nb-7Zr-5Ta caracterizada com íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e PO_3^{4-}

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontologia

Presidente e orientador: Dr. Luis Geraldo Vaz

2º Examinador: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior

3º Examinador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

4º Examinador: Prof. Dr. Rafael Silveira Faeda

Araraquara, 15 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES

Bárbara Araújo dos Reis

NASCIMENTO: 04/03/1994 – Goiandira – Goiás

FILIAÇÃO: Luís Antônio de Araújo e Rosair Maria dos Reis Araújo

- | | |
|--------------------|---|
| 2012 - 2015 | Graduação em Odontologia.
Universidade de Ribeirão Preto |
| 2015 - 2015 | Aperfeiçoamento em Extensão em Implantodontia.
Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia,
FAEPO |
| 2016 - 2016 | Aperfeiçoamento em Cirurgia oral menor.
Associação Brasileira de Odontologia - Araraquara |
| 2017 - 2017 | Aperfeiçoamento em Odontologia Hospitalar.
Educação Continuada do Portal de Educação |
| 2016 - 2018 | Mestrado em Odontologia, área de Biociência, Biomateriais e
Ciências Forenses.
Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAr/UNESP |
| 2018 - 2020 | Especialização em Implantodontia.
Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas- APCD/São Carlos |
| 2018 - 2021 | Doutorado em Odontologia, área de Implantodontia.
Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAr/UNESP |

Dedico esta tese de doutorado a todos aqueles que participaram da minha formação como pessoa, dentista e pesquisadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus por Seu amor infinito que cobre todas minhas fraquezas e por ser maior que todos os obstáculos na minha vida.

Aos meus pais Luís Antônio de Araújo e Rosair Maria dos Reis Araújo, que são minha inspiração diária e meus eternos educadores. Obrigada por construírem meu caráter, me ensinando princípios de honestidade, dignidade, responsabilidade, solidariedade, respeito ao próximo e esperança, que são cruciais em minha caminhada. E acima de tudo, obrigada pelos sacrifícios que vocês fazem diariamente para me darem o que nem vocês tiveram! Vocês ultrapassam sempre os deveres essenciais de pais! Amo vocês!

Aos meus irmãos Absaí Bernardes dos Reis Neto e Frederico Araújo dos Reis, por cuidarem sempre de mim, e por serem os melhores irmãos e amigos que alguém pode ter.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz, obrigada por cumprir com função de professor, mentor e principalmente amigo, por abrir portas no seletor mundo da pós-graduação brasileira, confiar em mim e agregar-me à sua equipe de trabalho.

Ao Professor Joni Augusto Cirelli e toda sua equipe, em especial a **Dra. Natália Da Ponte Leguizamón** e **Dra Mariana Cominotte**, por toda parceria, paciência e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Professor Cássio do Nascimento da FORP-USP e sua orientada Ma. Yumi Chokyu Del Rey, por disponibilizarem seu laboratório e serem sempre tão solícitos às nossas necessidades.

A todos os funcionários da FOAr-Unesp, cujo trabalho e dedicação possibilitaram a minha formação e realização dessa tese.

Ao LMA-IQ e ao técnico Diego pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À

FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(Proc. 2017/081927) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.
Charles Chaplin*

* <https://www.crmpr.org.br>

Reis BA. Comportamento de células MC3T3 e adesão bacteriana em liga β Ti-35Nb-7Zr-5Ta caracterizada com íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e PO_3^{4-} [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Reabilitações com implantes dentais são procedimentos rotineiros na prática odontológica atual. Altas taxas de sobrevivência do implante foram alcançadas nas últimas décadas devido a modificações contínuas no design do implante e na topografia da superfície, no entanto ainda há uma busca contínua para o controle da perda óssea peri-implantar. São escassos os trabalhos que apresentem dados da atividade osteoblástica nas superfícies tratadas concomitante a resultados da proliferação de bactérias nas mesmas, que podem desencadear perda óssea ou peri-implantite, processo patológico que deve ser considerado em longo prazo. O objetivo do trabalho foi desenvolver ligas de Ti-35Nb-7Zr-5Ta (TNZT), realizar tratamentos de superfície com íons cálcio e fosfato e íons magnésio por deposição de plasma eletrolítico (PEO) e avaliar os distintos tratamentos quanto a morfologia, composição química, rugosidade, molhabilidade e adesão do filme. Avaliou-se em seguida a adesão e proliferação de células MC3T3 com teste de alamar blue, FEG/SEM, MTT e fosfatase alcalina. As espécies microbianas foram identificadas e quantificadas pelo método de hibridização DNA-DNA Checkerboard. Foram avaliados 3 grupos diferentes: grupo polido (sem anodização), grupo CaP (β -glicerofosfato de sódio 0,04mol/L+ acetato de cálcio 0,35 mol/L, 300V, 2,5A, 60 seg) e grupo Mg (0,1 mol/L cloreto de Mg, 200V, 60seg). O grupo CaP e Mg alteraram a morfologia, rugosidade, molhabilidade e cristalinidade da liga TNZT. A adesão dos filmes do grupo CaP e Mg resistiram a uma maior força de tração. Menor quantidade total de bactérias foi identificada no grupo Mg e diferenças relevantes foram encontradas no perfil microbiano associado aos diferentes tratamentos de superfície. As células MC3T3 conseguiram aderir e proliferar mais rapidamente nos grupos tratados. No teste alamar blue o grupo CaP apresentou maior atividade metabólica no dia 21. No teste de fosfatase alcalina, o grupo CaP induziu maior expressão de ALP no dia 10. As análises preliminares in vitro sugeriram possíveis vantagens dos tratamento de superfície, sendo que o grupo CaP foi mais benéfico para adesão e proliferação celular, enquanto o grupo Mg reduziu a adesão de bactérias.

Palavras chave: Biofilmes. Titânio. Ligas. Biologia celular. Osseointegração.

Reis BA. Behavior of MC3T3 cells and bacterial adhesion in β Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy characterized with Mg^{2+} , Ca^{2+} and PO_3^{4-} ions. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

Dental implant rehabilitations are routine procedures in current dental practice. High implant survival rates have been achieved in recent decades due to continual modifications in implant design and surface topography, however there is still an ongoing quest to control peri-implant bone loss. There are few studies that present data on osteoblastic activity on treated surfaces, concomitant with the results of bacterial proliferation on them, which can trigger bone loss or peri-implantitis, a pathological process that should be considered in the long term. The objective of this work was to develop Ti-35Nb-7Zr-5Ta (TNZT) alloys, perform surface treatments with calcium and phosphate ions and magnesium ions by electrolytic oxidized plasma (PEO) and evaluate the different treatments in terms of morphology, chemical composition, roughness, wettability and adhesion of the film. The adhesion and proliferation of MC3T3 cells were then evaluated with the alamar blue, FEG/SEM, MTT and alkaline phosphatase tests. The microbial species were identified and quantified by the DNA-DNA Checkerboard hybridization method. Three different groups were evaluated: polished group (without anodizing), CaP group (sodium β -glycerophosphate 0.04mol/L+ calcium acetate 0.35mol/L, 300V, 2.5A, 60 sec) and Mg group (0,1 mol/L Mg chloride, 200V, 60sec. The CaP and Mg group changed the morphology, roughness, wettability and crystallinity of the TNZT alloy. The adhesion of the films of the CaP and Mg group resisted a higher tensile strength. Less amount total bacteria was identified in the Mg group and relevant differences were found in the microbial profile associated with the different surface treatments. MC3T3 cells were able to adhere and proliferate more quickly in the treated groups. In the alamar blue test, the CaP group showed greater metabolic activity on day 21 In the alkaline phosphatase test, the CaP group induced greater expression of ALP on day 10. Preliminary in vitro analyzes suggested possible advantages of surface treatments, with the CaP group being more beneficial for cell adhesion and proliferation, while the Mg group reduce the adhesion of bacteria on its surface

Keywords: Biofilms. Alloys. Titanium. Cell biology. Osseointegration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Tratamento de superfície e comportamento celular.....	12
1.2 Comportamento bacteriano.....	15
 2 PROPOSIÇÃO	 17
 3 PUBLICAÇÕES	 18
3.1 Publicação 1	19
3.2 Publicação 2	34
 4 CONCLUSÃO	 51
 REFERÊNCIAS	 52
 APÊNDICE A	 57

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da implantodontia moderna proposta por Branemark na década de 1960¹ até dias atuais, materiais a base de titânio são utilizados na manufatura de implantes dentários. O titânio comercialmente puro (TiCp) contém características interessantes, como biocompatibilidade, baixa densidade e boa resistência à corrosão,^{2,3} e além de ser biocompatível, propriedades mecânicas, físicas e químicas devem ser consideradas na manufatura dos implantes dentários para um melhor desempenho clínico a longo prazo.

De acordo com Letic-Gavrilovic et al.⁴, a combinação de propriedades ligadas à biocompatibilidade, à corrosão e ao comportamento mecânico faz do TiCp um material único em aplicações ligadas à ortopedia e à odontologia. Já para Mohamed et al.⁵, 2006 com a adição de outros elementos ao TiCp, obtendo as ligas de titânio, é possível agregar ao material propriedades ainda mais favoráveis, como menor módulo de elasticidade, otimização da osseointegração e ação antibacteriana.

Com a utilização das ligas de titânio, é possível aprimorar as propriedades biológicas, mecânicas, físicas e químicas que podem favorecer o desempenho a longo prazo dos implantes,⁶⁻⁸ e considerando que implantes dentais são submetidos constantemente a grandes esforços, é essencial a escolha minuciosa do material utilizado para confecção dos mesmos. A fabricação de dispositivos para implantes empregados na restauração de tecidos duros exige materiais com um conjunto específico de características que inclui elevada resistência à corrosão, ótima biocompatibilidade, alta resistência mecânica e baixo módulo de elasticidade

As ligas Ti6Al4V são utilizadas em aplicações odontológicas por suas excelentes propriedades mecânicas e resistência à corrosão. No entanto, seu módulo de elasticidade (~110 GPa) é bem mais elevado que o do osso humano (~10-30 GPa), o que gera a “proteção contra estresse”⁹. Esse efeito de proteção contra estresse, que origina da disparidade do módulo de elasticidade entre os materiais de implante e os ossos humanos, pode causar uma redução na densidade óssea e resultar no afrouxamento dos implantes em longo prazo. Além disso, a presença do elemento tóxico vanádio (V) na liga Ti6Al4V também gera preocupações pela liberação de íons tóxicos no corpo humano¹⁰.

Long et al.¹¹, 1998 avaliaram implantes de materiais metálicos de alta rigidez como o aço inoxidável ou ligas metálicas do sistema Cromo-Cobalto, e observaram que os materiais podem promover a reabsorção óssea, que eventualmente pode causar a soltura do implante ou mesmo a fratura do leito ósseo onde o implante foi inserido. Atualmente, esforços ligados ao desenvolvimento de materiais metálicos a serem aplicados na restauração de tecidos duros estão focados nas ligas de titânio do tipo β metaestável.^{7,12}

O titânio possui duas estruturas cristalinas, conhecidas como fases α e β . A fase α está relacionada à estrutura estável em temperatura ambiente, a qual é denominada estrutura hexagonal compacta. Ao elevar a temperatura a aproximadamente 883°C, a fase α transforma-se em β , representada por uma estrutura cúbica de corpo centrado¹³⁻¹⁵. Com a adição de elementos de liga ao Ti, são obtidas ligas com estruturas cristalinas estáveis em temperatura ambiente. As fases α e β são base para três tipos de ligas de Ti: α , $\alpha+\beta$ e β , que têm suas estruturas relacionadas com o tipo de elemento de liga utilizado¹⁴. Os elementos de liga podem ser classificados como α -estabilizador, β -estabilizador e neutro.

Para manufatura de implantes dentários é interessante utilizar ligas do tipo β por estas possuírem reduzido módulo de elasticidade e elevada resistência mecânica. Como estabilizador β típico de ligas de Ti, o elemento Nb tem muitas vantagens em relação às ligas de Ti, como a mesma estrutura cristalina do Ti, raio atômico semelhante, solução sólida infinita e nenhuma toxicidade biológica. No trabalho Bidaux J et al.¹⁶, 2014 mostraram que a adição de elemento Nb e Ta às ligas de Ti podem diminuir consideravelmente o módulo de elasticidade. A adição do elemento Zr às ligas de Ti pode aumentar a resistência à tração e suprimir a formação de martensita^{15,17}.

Sendo assim, é desejável que o material utilizado para manufatura de implantes tenha módulo de elasticidade próximo ao do osso humano¹⁸, resistência e plasticidade favoráveis na substituição de tecidos duros, sejam livres de elementos de toxicidade biológica e não sofram corrosão no meio biológico. Com a confecção de um material com características físico-mecânicas favoráveis, há possibilidade de elevar ainda mais a efetividade do material com tratamentos de superfícies.

A necessidade de encontrar um material biocompatível sempre motivou inúmeros estudos na área de biomateriais e pesquisas com implantes dentários fazem parte destas buscas por serem utilizados para recuperação ou reposição de parte funcional do corpo humano¹. Para cumprirem sua finalidade, implantes dentais devem ter ausência de toxicidade, ou seja, ser bioinerte. No entanto, após as diversas pesquisas na área, atualmente é possível obter implantes com superfícies bioativas que otimizam ainda mais o tratamento reabilitador^{19,20}. A forma de confecção e preparo dessas superfícies de titânio para utilização como implantes dentários passou do uso de superfícies simplesmente usinadas^{21,22} (ainda em uso), para superfícies altamente modificadas e funcionalizadas^{20,23}, que permitem alterações de uma ampla gama de propriedades da superfície da camada de óxidos de titânio.

Características macroscópicas e microscópicas dos implantes são constantemente aperfeiçoadas a fim de obter um material com propriedades que favoreçam a utilização destes

dispositivos inovadores em situações clínicas desafiadoras, nas quais podem haver um comprometimento da quantidade e qualidade do contato osso implante. Reabilitações com implantes curtos ainda não são muito utilizados por receio da perda de suporte ósseo no processo da reabilitação, no entanto, o aprofundamento de pesquisas para seleção de materiais corretos na fabricação dos dispositivos e tratamentos de superfícies efetivos, podem proporcionar uma melhor previsibilidade no tratamento a curto e longo prazo, evitando a morbidade das cirurgias de enxertos ósseos.

1.1 Tratamentos de superfície e comportamento celular

Em um implante, a osseointegração está relacionada com a competição entre fibroblastos e osteoblastos²⁴. Enquanto superfícies lisas favorecem o crescimento de fibroblastos, uma superfície mais irregular favorece o crescimento e fixação de células de osteoblastos. O crescimento de tecidos fibrosos na superfície do implante reduz a possibilidade de formação de uma ligação forte e bem estabelecida na interface osso-implante, que por sua vez depende das células osteoblásticas. Uma interação mecânica ineficiente entre o implante e o osso pode causar a perda do implante²⁵. O titânio e suas ligas possuem a característica de formação de uma camada de passivação de TiO₂ quando expostos ao oxigênio, e essa camada potencializa a bioatividade do material, favorecendo a osseointegração^{7,26}.

Estudos da literatura sugerem que o sucesso da osseointegração de implantes aumenta com a modificação da superfície dos mesmos, produzindo uma camada superficial de TiO₂ nano-estruturada^{27,28}. A composição química da camada de TiO₂ está diretamente relacionada a biocompatibilidade do material⁷.

Diversas técnicas são utilizadas para essas modificações superficiais, como revestimento de vidro bioativo, jateamento com spray, técnicas de sol-gel, anodização eletroquímica, entre outros, transformando as superfícies em potencialmente bioativas²⁹⁻³¹. A deposição por Plasma Eletrolítico (PEO) modifica a camada do filme de óxido de titânio, tornando-a mais aderente e porosa, com melhores propriedades biológicas²⁹. O mecanismo da modificação da camada de óxido sob condições de anodização é bem conhecido^{2,29,32}.

Superfícies de implantes submetidos à PEO, apresentam características morfológicas que facilitam a adesão, orientação e formação óssea com maior rapidez, permitindo a inserção dos implantes em regiões com baixas densidades e acelera o carregamento dos implantes³³.

Esta técnica de oxidação consiste em um sistema de formação ânions e cátions que permite a incorporação de substâncias do eletrólito à interface do material, permitindo a

formação de revestimentos com morfologia e química semelhante à composição mineral do tecido ósseo, como quando utilizado íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato(PO_3^{4-}) na solução eletrolítica. A incorporação destes íons é uma modificação de superfície comumente utilizada para alterar a camada de óxido do titânio, e sabe-se que incorporação de íons Ca^{2+} e PO_3^{4-} auxiliam a formação de apatita óssea e maior adesão e proliferação de osteoblastos³⁴, sendo relevantes no metabolismo e mineralização óssea, angiogênese e homeostase dos tecidos ósseos³⁵.

Conforme mostrado por Ellingsen et al.³⁶, 1991 a presença de cálcio na superfície do implante aumenta a taxa de precipitação da hidroxiapatita, devido ao aumento da capacidade de absorção de proteínas. Resultados semelhantes foram observados por Jones et al.³⁷, 2001. Conforme explicado por Guo et al.³⁸, 2012 os íons Ca^{2+} têm a capacidade de atrair proteínas, resultando em uma osseointegração mais rápida³⁸.

Segundo Gnedenkov et al.³⁹, 2017 o mecanismo da influência dos revestimento de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo é mediado por diversos fatores, um dos quais é o envolvimento do revestimento bioativo no processo de formação do novo tecido ósseo como provedor dos elementos necessários, particularmente cálcio e fósforo. As propriedades físicas e químicas da hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, conferem-lhe biocompatibilidade, estimulando reestruturação do tecido ósseo. Outra influência é o aumento da resistência de união entre o tecido ósseo e o implante devido a composição química do revestimento, que consiste em materiais nativos do corpo.

Outro tratamento de superfície viável por PEO é incorporação de magnésio à camada de óxido do titânio, que é capaz de regular a expressão das integrinas nas células ósseas no estágio inicial da osteogênese, sendo crucial para formação e metabolismo ósseo⁴⁰. A dopagem com íons Mg^{2+} promove a diferenciação osteoblástica de células humanas indiferenciadas^{41,42}, aumenta a calcificação e a densidade mineral de osso⁴³, além de acelerar a osseointegração ao redor de implantes⁴⁴⁻⁴⁷.

Sul et al.⁴⁸, 2005 adicionaram íons de Mg^{2+} em implantes de TiCp pela técnica da PEO. Utilizaram duas placas de platina como cátodos e os implantes como ânodos. O grupo controle foi oxidado em ácido acético e o grupo teste foi oxidado em um eletrólito contendo íons Mg^{2+} . Em seguida, implantes de ambos grupos foram inseridos nos fêmures de coelhos por 6 semanas, e analisaram a resistência ao torque destes implantes. No grupo teste (Mg), o valor do torque de remoção foi consideravelmente maior que no grupo controle, concordando então com as evidências positivas para a teoria de ligação bioquímica mediada por química de superfície de implantes bioativos oxidados.

Sul et al.⁴⁹, 2006 compararam a velocidade, a força da osseointegração e a osteocondutividade entre um implante experimental oxidado com íons Mg^{2+} , um implante TiUnite oxidado disponível comercialmente e um implante Osseotite de superfície com duplo ataque ácido. O objetivo foi avaliar quais propriedades de superfície aumentariam a resposta óssea aos implantes e, assim, testar uma teoria de ligação bioquímica. Os resultados indicaram que a superfície que facilitou a osseointegração mais rápida e mais forte dos implantes foi o grupo incorporado com Mg^{2+} , apesar de sua aspereza mínima em comparação com TiUnite moderadamente rugoso. Isso sugere vantagens potenciais dos implantes de Mg para reduzir taxas de falha do implante no estágio pós-implantação inicial e em áreas ósseas comprometidas, tornando possível encurtar o tempo de cicatrização óssea desde a cirurgia até a carga funcional, aumentando a possibilidade de carga imediata.

Kim et al.⁴¹, 2012 incorporaram íons Mg^{2+} em discos de Ti após jateamento de areia mais ataque ácido, usando uma técnica de implantação de íons por plasma. Os íons foram implantados em toda superfície desejada, utilizando uma fonte de plasma metálico. Este plasma de íons metálicos foi gerado por uma fonte em arco a vácuo e incorporando na superfície dos discos. Discos apenas com jateamento mais ataque ácido foram utilizados como controle. Células mesenquimais humanas foram cultivadas para avaliar proliferação e adesão celular por meio de ensaio MTT. No dia 1, a proliferação de células cultivadas em SLA Ti ($0,37 \pm 0,03$) foi menor que a das células cultivadas em Ti Mg-SLA ($0,62 \pm 0,06$) e esta diferença foi observada continuamente até 15 dias.

Na-Ren et al.⁵⁰, 2014 compararam superfícies modificadas com íons Mg, íons Ca e grupo controle sem tratamento. Em seguida cultivaram células de medula óssea de ratos sobre as superfícies, para ver a efetividade da adsorção de proteína e também a capacidade de aumentar a adesão e diferenciação destas células. Notaram que nas amostras contendo Mg^{2+} e Ca^{2+} , o número de células aumentaram até quatro vezes em relação ao controle, e o grupo com Ca^{2+} teve uma pequena vantagem em relação ao grupo com Mg^{2+} na diferenciação celular.

Galli et al.⁴⁰, 2016 incorporaram íons Mg^{2+} em implantes de titânio, e avaliaram a liberação destes íons em modelos animais osteoporóticos. Implantes sem nenhum revestimento foram utilizados como controle. Os resultados mostraram que após a colocação dos dispositivos, houve formação do coágulo em torno dos implantes e novo tecido osseo foi visível após 7 dias de instalação dos mesmos, sendo que o volume de tecido ósseo neoformado foi consideravelmente maior nos espécimes revestidos com íons Mg^{2+} .

Wang et al.⁵¹, 2016 avaliaram a proliferação e diferenciação de células pré osteoblásticas MC3T3 em implantes de Ti6Al4V contendo íons bioativos (Ca^{2+} e Mg^{2+})

adicionados por processo hidrotermal. Os resultados dos testes in vitro indicaram que Ca^{2+} e Mg^{2+} na superfície da liga de titânio favoreceu a fixação, proliferação e diferenciação das células. As células cultivadas em superfície com íons Ca^{2+} exibiram níveis de diferenciação significativamente maiores nos testes de ALP e atividade mineralização em comparação com a superfície modificadas com íons Mg^{2+}

1.2 Comportamento bacteriano

A rugosidade da superfície de implantes dentais parece ser um fator importante na capacidade de colonização de certas espécies bacterianas⁵². Bactérias preferencialmente aderem em superfície que se conformam ao seu tamanho, uma vez que isso maximiza a área de superfície da bactéria. Irregularidades das superfícies proporcionais ao tamanho da bactéria aumentam sua área de contato e, portanto, o potencial de ligação, enquanto as irregularidades muito maiores que o tamanho da bactéria se aproximam do potencial de ligação de uma superfície plana⁵³. Para uma determinada superfície, diferentes espécies de bactérias se aderem de maneira diferente, uma vez que apresentam diferentes características físico-químicas. Geralmente, as bactérias com propriedades hidrofóbicas preferem superfícies de material hidrofóbico; aqueles com características hidrofílicas preferem superfícies hidrofílicas

54

A incorporação de íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e Mg^{2+} são capazes de alterar diversos fatores no titânio e suas ligas que interferem na atividade osteoblástica e antibacteriana, como rugosidade, hidrofiliabilidade, fase cristalina da superfície, composição química e cargas de superfície. De acordo com Wang et al.⁵⁵, 2019 cations divalentes são relacionados ao aumento da formação de biofilme especialmente por sua capacidade de ligação a superfície das bactérias carregadas negativamente. Íons Ca^{2+} participam da fixação de bactérias mediada por adesina sendo capaz de modificar sua estrutura, e esta, ao se ligar à estrutura dos íons, fortalece e facilita a extensão da proteína da superfície da célula ao substrato⁵⁶. No entanto pesquisadores observaram um efeito inibitório mediado por proteínas causado pela adição de Ca^{2+} em biofilmes de *Staphylococcus aureus*.⁵⁷

No estudo de Robinson et al.⁵⁸, 2010 observaram que a degradação do Mg^{2+} em uma solução fisiológica poderia resultar em aumentos rápidos tanto da concentração de Mg^{2+} quanto do valor do pH na solução, e este último é capaz de inibir a sobrevivência bacteriana, conferindo uma função antibacteriana do magnésio. Isso ocorre porque as bactérias conseguem se manterem vivas geralmente em um ambiente com pH de 6,0-8,0, sendo

geralmente este o limite em que as bactérias conseguem manter um pH citoplasmático compatível com as integridades funcionais e estruturais das proteínas citoplasmáticas.

Mihailescu et al.⁵⁹, 2016 recobriram superfícies de titânio com hidroxiapatita, MgF_2 ou MgO , e em seguida testaram o potencial microbiológico destes tratamentos em três cepas isoladas de pacientes: *Micrococcus* sp., *Enterobacter* sp. E *Candida albicans* sp. Os filmes contendo MgO induziram uma diminuição da adesão de *Micrococcus* sp e *Enterobacter* sp, quantificadas após 24 h de incubação, em relação ao controle de Ti. Além disso, após 48 h, o mesmo grupo diminuiu pelo menos 1 log a capacidade das cepas *Enterobacter* sp e *Candida* sp de se aderirem e multiplicarem na superfície testada.

No entanto, alguns autores mostram que a perda óssea marginal em torno de implantes moderadamente ásperos são maiores em comparação com o implante de superfície lisas, apesar de não ser significativo estatisticamente^{60,61}. Considerando que atualmente a periimplantite é uma condição clínica recorrente e essas superfícies que visam otimizar a osseointegração são possíveis materiais para fabricação de implantes curtos, é interessante entender a influência de tais tratamentos no comportamento bacteriano.

Grande parte dos trabalhos foram realizados em TiCp ou ligas de Ti-6Al-4V. Não há trabalhos que relatem o comportamento de células osteoblásticas e de bactérias em ligas de Ti-35Nb-7Zr-Ta após tratamento por PEO com íons promissores osteogênicos, como Ca^{2+} , PO_4^{3-} e Mg^{2+} , bem como não há um consenso sobre qual tratamento é mais efetivo ao avaliar o potencial osteoindutor e antibacteriano dos biomateriais.

Assim, elementos de liga de Nb, Zr e Ta foram selecionados neste trabalho para formar uma liga β de titânio, originando a liga Ti-35Nb-7Zr-Ta que foi fundida e depois submetida distintos tratamentos de superfície, para avaliarmos detalhadamente os efeitos da modificação da superfície via PEO, originando 3 grupos, sendo um sem anodização (polido), o segundo grupo com adição de Ca^{2+} e PO_4^{3-} (CaP) e o terceiro com adição de Mg^{2+} (Mg).

Testes de morfologia, composição química, difração de raio x, modulo de elasticidade, tensão e deformação foram realizados em 9 amostras de cada grupo. Em seguida, células MC3T3 foram cultivadas nos discos e todos os grupos com os respectivos tratamentos foram avaliados a viabilidade celular após cultura células mesenquimais da medula óssea de ratos avaliados pelo MEV, Alamar Blue, MTT e fosfatase alcalina. Por fim, espécies microbianas foram identificadas e quantificadas pelo método de hibridização DNA-DNA Checkerboard. A metodologia detalhada está no Apêndice A.

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo específico 1: Desenvolver e caracterizar liga de Ti-35Nb-7Zr-5Ta, com eletrólitos íons Ca e P e Mg por anodização potencioestática para obter um material com melhores características físico- química, mecânicas e biológicas e avaliar as propriedades de superfície (topografia superficial, composição química, rugosidade média, molhabilidade e teste de adesão do filme); todas análises foram feitas antes e após o a caracterização das amostras.

Objetivo específico 2: Avaliar a adesão e proliferação celular nos discos de titânio tratados.

Objetivo específico 3: Identificar e comparar quantitativamente, pelo método de hibridização Checkerboard DNA-DNA Hybridization, a presença de até 35 espécies microbianas, incluindo micro-organismos comensais e patogênicos, no biofilme oral formado sobre os espécimes tratados e controles;

Hipótese alternativa: A hipótese alternativa testada neste estudo foi a de que as superfícies experimentais desenvolvidas seriam capazes de aumentar a adesão e proliferação das células MC3T3 e minimizar a formação ou alterar a composição e viabilidade de biofilmes orais formados quando comparados a superfícies de TNZT polidas

3 PUBLICAÇÕES

O desenvolvimento da tese resultou dois trabalhos, relatados na forma de artigos:

Publicação 1: Bacterial response to Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy incorporated with Calcium, Phosphate and Magnesium

Publicação 2: Osteoblastic response to Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy incorporated with calcium, phosphate and magnesium

3.1 Publicação 1*

Bacterial response to Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy incorporated with Calcium, Phosphate and Magnesium

Authors: Bárbara Araújo dos Reis, Natalia Da Ponte Leguizamón, Yumi Chokyu Del Rey, Leandro Fernandes, Cássio do Nascimento, Luis Geraldo Vaz.

ABSTRACT

To perform physicochemical and morphological characterization of a Ti-35Nb-7Zr-5Ta (TNZT) alloy surface modified by electrolytic oxidative plasma technique and evaluate bacterial colonization in an in vitro experimental model, a total of 3 groups were evaluated: C group (polished TNZT), CaP group (sodium β glycerophosphate + calcium acetate) and Mg group (magnesium acetate). Before and after anodizing the surfaces, physicochemical and morphological analyzes were performed: scanning electron microscopy with field emission gun (FEG-SEM), energy dispersion spectroscopy (EDS), X-ray diffraction (DRX), wettability (goniometer) and roughness (rugometer). Controlled and treated specimens were exposed to contamination by unstimulated saliva collected from 10 healthy volunteers. Then, biofilm samples were collected and up to 35 microbial species, including commensal and pathogenic microorganisms, were identified and quantified by the *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* method. The CaP group modified the surface morphology in the form of pores, while the Mg group modified it in the form of flakes. The contact angle was significantly smaller in the CaP group. The average roughness was higher in the CaP and Mg groups. A smaller total amount of bacteria was identified in the Mg group and relevant differences were found in the microbial profile associated with different surface treatments.

Keywords: Dental implants; Surface Properties; Biofilm; Titanium; Alloys

* O artigo segue as normas do periódico Journal of Materials Science no qual foi submetido

The constant evolution of dental implants has established implant dentistry as one of the best rehabilitation treatment plans, with survival rates above 90% in recent years,¹ compared to 66% or less in the first years of technology.² However, this data is far from ideal, especially in patients at high risk of complications such as diabetics, periodontal patients, and patients using bisphosphonates, among others, which justifies the constant search for the development of new biomaterials.

The main improvements in the performance of implants are directed towards making titanium (Ti) alloys and improving their surface. The development of alloys with the addition of elements such as niobium (Nb), zirconium (Zr), and tantalum (Ta) are options for making alloys that add interesting biomechanical characteristics to titanium.^{3,4} Niobium (Nb) is a typical β stabilizer of Ti alloys and has many advantages for having the same cubic centered body structure as titanium (ccc), similar atomic radius, without presenting biological toxicity. Previous works^{5,6} showed that the addition of Nb and Ta elements to Ti alloys can considerably decrease the modulus of elasticity. Zr suppresses the omega (ω) phase in quaternary alloys and is also considered responsible for the decrease in the modulus of elasticity reaching values of 55 GPa when these alloys are compared to binary alloys containing similar amounts of Nb.⁶⁻⁸ The improvement of surfaces is carried out by various techniques, such as acid etching, hydrothermal treatment, sandblasting, laser, plasma electrolytic oxidation (PEO), and anodizing, among others. PEO is capable of modifying the titanium oxide film layer using high voltages, making it more adherent and porous, with better biological properties,⁹ in addition to enabling the incorporation of ions into the oxide layer.

The incorporation of calcium (Ca^{2+}) and phosphate (PO_4^{3-}) ions is commonly performed by PEO. It is known that incorporation of these ions helps the formation of bone apatite and greater adhesion and proliferation of osteoblasts.¹⁰ Beneficial effects are also reported with the incorporation of magnesium ions (Mg^{2+}) in implants to significantly increasing the adhesion of osteoblastic cells through signaling pathways mediated by $\alpha 5 \beta 1$ and $\beta 1$ integrins.¹¹ Despite this encouraging data, it is necessary to assess the interference of these innovations in future clinical complications, both related to material properties and their impact on microbial biofilm formation. Changing surfaces can influence the adhesion and proliferation of bacteria and consequently, result in marginal bone loss around implants. When an implant surface is exposed to microorganisms, there will be adhesion or repulsion of bacteria depending on the result of different interactive forces, these interactions being highly influenced by surface wettability, surface charge (positive or negative electromagnetic interactions), roughness and other chemical characteristics of the surface.¹²

It is believed that divalent cations such as Mg^{2+} and Ca^{2+} can affect the initial fixation of bacteria in biofilm formation, bridging the gap between molecules due to the attraction of cations and the extracellular matrix of negatively charged bacteria, which plays a positive role in structural stability of the biofilm.¹³ However, the influence of divalent cations on the physiological functions of bacterial biofilms is reflected by the electrolyte composition, such as concentration and type of cation as well as the bacterial species.

Regarding the proportions of bacterial species, surface roughness seems to be an important factor in the colonization capacity of certain species.¹⁴ Bacteria preferentially adhere to surfaces that conform to their size, as this maximizes the bacteria's surface area. Surface irregularities proportional to the size of the bacteria increase its contact area and,

therefore, the binding potential, while irregularities much larger than the bacteria size approach the binding potential of a flat surface.¹⁵ For a given surface, different species of bacteria adhere differently, as they have different physicochemical characteristics. Generally, bacteria with hydrophobic properties prefer surfaces of hydrophobic material; those with hydrophilic characteristics prefer hydrophilic surfaces.¹²

The crystallinity of the oxide formed on the surface also seems to influence the bacterial response to the biomaterial. When titanium dioxide is crystallized in the anatase phase, antibacterial properties are expressed through the formation of anionic oxygen species.¹⁶

Factors such as chemical composition, hydrophilicity, crystalline phase, nanotopography and surface charges can also be modified on titanium or titanium alloy surfaces to favor or disprove antibacterial activity. Strategies such as the development of new alloys and the functionalization of implant surfaces must be explored to obtain a biomaterial capable of optimizing osseointegration without increasing the potential for bacterial adhesion, and in an even better situation, being able to inhibit bacterial adhesion and prevent infections.

Titanium β alloys and surface treatments with CaP and Mg have proven osteogenic potential, but little is known about their influence on bacterial colonization, making it essential to evaluate the potential of these new implant surfaces in controlling biofilm. If biomaterials used as dental implants increase the osteoinductive/osteoconductive/ostegenic potential and also increase the adhesion of bacteria, it will be necessary to carry out a careful analysis to assess the risk/benefit of such therapies. Hence, it is expected that surfaces developed to enhance osseointegration do not cause an imbalance in the oral microbiota, or, in an ideal situation, that they are able to reduce colonization by species considered pathogenic. Therefore, the aim of this study was to develop a titanium β alloy composed of Ti-35Nb-7Zr-5Ta and characterize the experimental surfaces by the PEO technique with incorporation of Ca^{2+} , PO_4^{3-} and Mg^{2+} ions. Morphological, chemical, wettability and surface roughness changes were evaluated, as well as the effect of surface treatment on the colonization of up to 35 species of microorganisms present in the oral cavity.

METHODOLOGY

MATERIAL AND METHOD

The Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy was obtained by the arc-voltaic casting method, with inert atmosphere, controlled by vacuum pump and argon flow. After casting, the ingots were subjected to a heat treatment of homogenization at 1000 °C for 8 hours (vacuum), then were forged and machined in the form of discs.⁴ All discs were submitted to finishing and polishing in a polish machine with silicon carbide-SiC sandpaper (Norton Abrasivos do Brasil, São Paulo, SP, Brazil) of 120, 320, 600, 1200 and 2000 grains.

The specimens were mounted in an electrochemical cell connected to a digital multimeter and an energy source (N5771A, Agilent Technologies do Brasil São Paulo, SP, Brazil) to carry out electrolytic oxidation by plasma. Group C is composed of untreated discs. For the CaP group, we used a protocol for the formation of micropores with incorporation of Ca^{2+} and PO_4^{3-} , in an electrolyte composed of 0.04 mol/L of sodium β -glycerophosphate

(Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, USA) plus 0.35 mol/L calcium acetate (Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, USA). The current source was adjusted to 300V with varying electrical current intensity, starting at 2.5A, for 60 seconds. For the Mg group, we used a magnesium acetate electrolyte at a concentration of 0.1 mol/L⁴ with a voltage of 200V, current of 2A for 60 seconds.

The topography of the samples was evaluated before and after PEO in a scanning electron microscope (Jeol JSM6610LV, Akishima, Tokyo, Japan) to evaluate the surface morphology. For semi-quantitative chemical analysis, we used the energy dispersive X-ray (EDS) technique (INCA 250, Oxford Instruments, Concorde, New Hampshire, USA), in order to detect the elements present on the surface. X-ray diffraction (XRD) with copper K α was used to evaluate the crystal structure of all samples. The constants of each phase were calculated from low angle peaks with known Miller indices, cell type and internal standard.¹⁷

The wettability of the samples was evaluated by the value of the contact angle (AC) using a goniometer (Ramé-Hart 100-00, Succasunna, NJ, USA), with drops of distilled water dispensed on the surface of the samples by a syringe always the same size of droplet. This AC was measured after 20 seconds and repeated three times for each sample. Linear surface roughness (Ra) and area roughness (Sa) were measured before and after the anodizing procedures, in a roughness meter (Mitutoyo SJ 400 – Mitutoyo Corporation - Japan). Three measurements were taken on each surface and the mean between readings was determined as the value of Ra (μm) and Sa of each sample.

Unstimulated human saliva was used as a contaminating medium for disc incubation. Exclusion criteria was under 18 years old, pregnancy, lactation, smoking, presence of systemic diseases, active caries lesions, periodontal disease and use of antibiotics in the last 3 months or medications that could influence the periodontal condition. Participants were instructed in writing and orally about the objectives of the study and the steps involved in their participation. The study was approved by the Ethics Committee of the School of Dentistry of Araraquara, registration number 46325221.0.0000.5416. 5 mL of unstimulated saliva was collected from 10 periodontal healthy individuals aged between 27 and 35 years old (mean age 31.40 ± 1.14) and mixed in a 50mL Falcon tube. Five discs from each group were incubated in 2 mL eppendorfs, containing 1 mL of the contaminating medium. This volume was enough to cover the discs preventing leakage of contaminant medium. After seven days of incubation at 37°C, the discs were removed from the microtubes and the biofilm formed on the specimens was collected individually with the aid of a microbrush brush rubbed over the surface of the disc for 20 seconds. The tip of each microbrush was placed in identified microtubes containing 250 μL of TE buffer solution to preserve the stability of the genetic material of the biofilm samples. Then, 150 μL of 0.5 M sodium hydroxide (NaOH) solution was added to the microtubes in order to allow cell lysis and suspension of genomic DNA of microorganisms in the solution. The samples were kept at room temperature until the time of microbial assays to avoid freeze-thaw cycles that could affect the integrity of the DNA. All contamination tests were carried out under aseptic conditions, in a laminar flow hood and using sterile instruments and gloves.

Thirty-three bacteria and 2 Candida species were defined as target species, described in table 1. The genomic DNA of all target species was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC®, USA). The genomic probes of the 35 target-detection species

were made according to the protocol established by the genomic marker manufacturer (AlkPhos Direct Labeling and Detect System, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

After collecting the biofilm from the discs, samples were evaluated by *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* technique, a semi-quantitative molecular method of microbiological diagnosis that is based on the occurrence of hybridization reactions (DNA-DNA binding) between labeled DNA probes by fluorescence for each of the target species for detection and the genomic DNA of the microorganisms present in the analyzed samples, as described in.¹⁸ Briefly, standards containing a known number of microbial cells (10^5 and 10^6 cells) for each of the target species were analyzed simultaneously with the analyzed biofilm samples to serve as a comparison standard for quantification. Thus, by detecting the intensity of fluorescent signals generated by the DNA-DNA hybridization reaction and comparing them to controls, it is possible to estimate the number of cells of each target species in the investigated biofilm samples.

Table 1: Microbial species (and respective ATCC Number) used for preparation of the target-specific DNA probes.

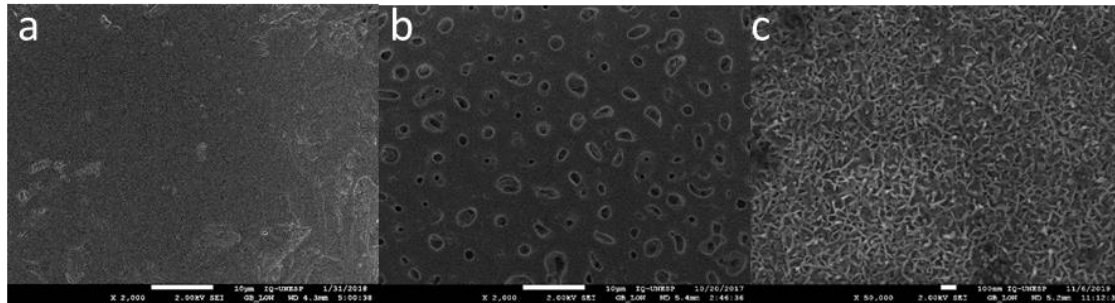
Bacteria	ATCC Number
Aggregatibacter actinomycetemcomitans a	29523
Bacteroides fragilis	25285
Capnocytophaga gingivalis	33624
Campylobacter rectus	33238
Campylobacter gracilis	33236
Escherichia coli	2193
Enterococcus faecalis	23834
Fusobacterium nucleatum	51299
Klebsiella pneumoniae	33693
Lactobacilos casei	334
Lactobacillus acidophilus	4356
Pseudomonas aeruginosa	27853
Peptostreptococcus anaerobius	27337
Porphyromonas endodontalis	35406
Porphyromonas gingivalis	33277
Prevotella intermedia	25611
Prevotella melaninogenica	25845
Parvimonas micra	33270
Prevotella nigrescens	25261

Pseudomonas putida	12633
Staphylococcus aureus	25923
Streptococcus gordonii	10558
Streptococcus mitis	49456
Solobacterium moorei	CCUG39336
Streptococcus mutans	25175
Streptococcus parasanguinis	15911
Streptococcus salivarius	25975
Streptococcus sanguinis	10556
Streptococcus pneumoniae	55143
Streptococcus gallolyticus	700066
Treponema denticola	35405
Tannerella forsythia	43037
Veillonella parvula	10790
Candida	
Candida dubliniensis	44508
Candida tropicalis	66029

RESULTS

The C group presented a smooth surface with grooves compatible with the sandpaper used for polishing (Figure 1A), without formation of specific structures. The CaP group resulted in the formation of uniform surfaces with pore characteristics (Figure 1B) and the Mg group resulted in the formation of uniform surfaces with flaky characteristics (Figure 1C).

Figure 1: Microscopy of study surfaces. 1A: C group; 1B: CaP group; 1C: Mg Group



EDS analysis showed incorporation of Ca^{2+} and PO_4^{3-} in the CaP group and Mg^{2+} in the oxide layer of the Mg group, and did not show contamination after the anodizing process (Table 2). X-ray diffraction (XRD) patterns of treated and untreated surfaces at an incidence angle of 10° to 90° are shown in Figure 2. The untreated TNZT surface (pink line in Figure 2) exhibited only the β phase, as shown by the presence of peaks (1 1 0), (200) and (2 1 1). No alpha phase was detected. This is due to the presence of beta-stabilizing elements (Nb, Zr and Ta) in the material that suppresses the formation of the alpha phase. After the heat treatment, the peak $2\theta = 25.5^\circ$ appeared in the treated groups, indicating the presence of the anatase phase.

Significant differences were obtained as a function of anodizing ($p < 0.0001$). For analysis and evaluation of the results obtained, mean and standard deviation were used. The results of R_a and A_{cs} exhibited normal distribution and were analyzed using two-way analysis of variance, *two-way* ANOVA followed by Tukey's test ($\alpha = 0.05$). The mean roughness of the samples from the treated groups was statistically higher than that of group C, with no statistical difference between CaP and Mg groups (Table 3). In general, the mean square values (S_z) are in agreement with the mean roughness values, demonstrating the good homogeneity of the samples. Contact angle measurements showed that all groups present values below 90° using distilled water, thus suggesting a qualitatively hydrophilic character ($\theta > 90^\circ$). There was a statistically significant difference in the values of CAs in the Mg group compared to CaP and C groups (Mg = 41.4° , CaP = 50.4° , C = 56.6°). (Table 3).

Figure 2: XRD analysis of smooth samples and CaP and Mg groups with a predominance of the β phase

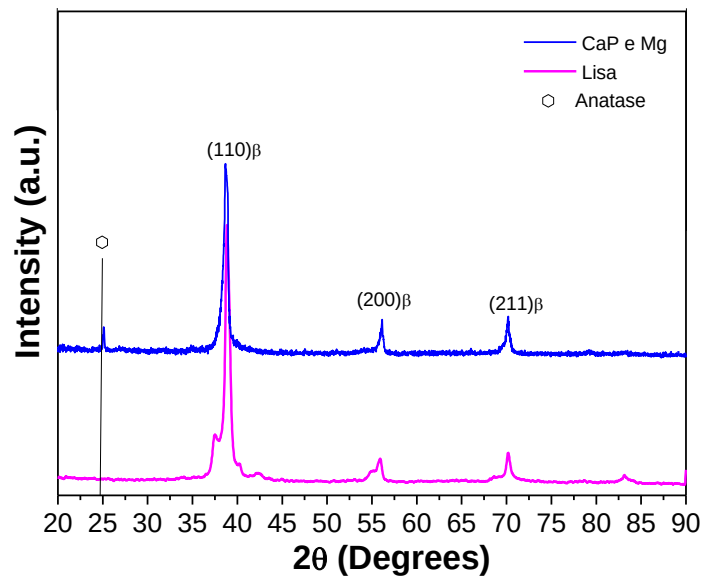


Table 2: EDS of study samples

Element	G1	G2	G3
Ti	52,98	28,43	19,24
Nb	36,06	8,81	6,46
Zr	6,23	1,52	1,47
Ta	4,73	0,63	0,51
Ca		8,15	
P		4,01	
Mg			12,36
O		44,45	58,96

Table 3: Linear surface roughness (Ra), area roughness (Rz), wettability (CA) of the study groups

Grups	Ra(μm)	Sz(μm)	Ca($^\circ$)
C	0,26($\pm 0,3$) ^B	2,30 $\pm 0,4$ ^B	55,6($\pm 2,9$) ^B
CaP	0,54($\pm 0,8$) ^A	4,09 $\pm 0,4$ ^A	50,4($\pm 4,5$) ^B
Mg	0,61($\pm 0,3$) ^A	4,66 $\pm 0,3$ ^A	41,4($\pm 3,1$) ^A

Among the 35 microorganisms investigated, 9 were detected in all groups, described in table 4, which illustrates the median, first quartile, third quartile, maximum and minimum values of the total microbial count recorded for the 3 study groups.

Non-parametric Brunner and Langer test (Non-parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments) was used to analyze the inference of treatments on the total microorganism count, without discriminating between the different investigated species. The relative effect of the group factor (treatment) was significant for the microorganism count, according to Wald-Type Statistics (WTS): $p < 4.23 \times 10^{-5}$ and ANOVA-Type Statistics (ATS): $p < 4.36 \times 10^{-6}$. The analysis of multiple comparisons (pairwise multiple comparisons), with Bonferroni correction, showed differences in the total bacterial count between groups C and Mg ($p < 5.13 \times 10^{-5}$). Species and treatment factors showed significant isolated effects, $p = 0.0000$ and $p < 1.15 \times 10^{-13}$, respectively. Treatment/species interaction also had a significant effect; $p < 1.18 \times 10^{-6}$. GEE (Generalized Estimating Equations) test was used to investigate each of the species in the different proposed treatments (Table 2).

The strict anaerobic bacteria *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas endodontalis* and *Peptostreptococcus anaerobios*, and the green complex bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* were identified in smaller amounts in the Mg group. The opportunistic species *Klebsiella pneumoniae* and *Candida tropicalis* showed preferential colonization in group C. As for the red and orange complex bacteria, *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* respectively, no clear trend was identified between groups and all groups had relatively low counts of such species.

Table 4: Medians (first/third quartiles) of microbial counts ($\times 10^5$) obtained by DNA-DNA Checkerboard hybridization technique and the respective P values for comparison between groups obtained by GEE analysis with a significance level of 0.05

	C	CaP	Mg	P-value
<i>Prevotella melaninogenica</i>	3,72(3,73/4,39)	3,70(0,85/1,55)	2,66(0,68/1,41)*	0,0117
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1,29(0,96/1,63)	1,59(0,81/2,59)	1,91(0,85/3,46)	0,9441
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	2,34(3,17/4,30)*	3,85(2,32/4,60)	0,99(0,83/3,88)*	0,0094
<i>Peptostreptococcus anaerobios</i>	2,34(1,72/2,66)	4,01(3,86/4,18)	0,99(0,82/188)*	0,0347
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,48(1,88/2,10)*	1,72(1,33/3,28)	1,00(0,99/1,45)	0,0465
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3,26(2,45/3,51)	2,51(1,58/2,96)	2,03(0,87/2,50)	0,5345
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	2,54(2,52/2,94)	3,98(2,89/4,42)	1,78(1,26/4,04)	0,0525
<i>Candida tropicalis</i>	4,09(3,64/4,45)*	1,03(0,85/1,55)	1,01(0,69/1,41)	0,0252
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	6,00(5,69/6,88)	5,41(5,16/5,94)	4,75(4,51/5,42)*	<0,0001

DISCUSSION

Factors such as biomaterial chemical composition, hydrophilicity, surface crystalline phase, nanotopography and surface charges can be modified on surfaces or titanium alloy to provide osteoblastic and/or antibacterial activity. Previous studies have shown that titanium concentrates more biofilm mass and greater amounts of microorganisms.¹⁹ In the present study, we used TNZT titanium alloy B and anodizing technique to modify the surface with the addition of ions with osteogenic potential, and we evaluated the bacterial response using the checkerboard technique on these surfaces.

Our results agree with previous studies that showed that the incorporation of ions into the TNZT alloy may not enhance biofilm formation depending on the concentration and time of exposure to the ions.¹³ Therefore, if titanium surfaces are attractive to bacteria, strategies such as chemical modification and functionalization of implant surfaces must be altered in order to inhibit adhesion and prevent infection.

Due to their excellent biocompatibility and good mechanical properties, titanium β alloys are promising materials for making implants.⁵ These alloys have superior properties over the Ti-6Al-4V alloy that is used clinically, such as lower Young's modulus and better biocompatibility. Furthermore, the TNZT alloy is known for its extremely high corrosion resistance and thermodynamic stability.²⁰ Corrosion resistance can reduce the chance of early implant failure caused by the combined effect of corrosion and wear. With the rapid development of surface modification technologies over the last few years, many surface treatment techniques have been reported to improve the wear resistance of titanium alloys, as reported by Oliveira et al.²¹ which obtained an excellent tribocorrosive behavior on surfaces modified with Ca, P and Mg.

The incorporation of Ca, P and Mg ions is able to change several factors in titanium and its alloys that interfere in the osteoblastic and antibacterial activity, such as roughness, hydrophilicity, surface crystalline phase, chemical composition and surface charges. Divalent cations are related to increased biofilm formation, especially due to their ability to bind to the surface of negatively charged bacteria,¹³ so special attention is needed when incorporating these ions into implant surfaces to verify the influence of the modification on bacterial behavior. Calcium participates in bacterial fixation mediated by adhesin, being able to modify the adhesin structure, and when it binds to the Ca^{2+} structure, it strengthens and facilitates the extension of the cell surface protein to the substrate.²² However, researchers have observed a protein-mediated inhibitory effect caused by the addition of Ca in *Staphylococcus aureus* biofilms.²³

P. aeruginosa strain was increased with the addition of Mg^{2+} , but this was not observed with the other three strains of *P. aeruginosa* tested.²⁴ However, other authors found that Mg degradation is responsible for increasing the alkalinity of the environment, pH above 9, and consequently inhibiting bacterial survival. Robinson et al.²⁵ considered that the characteristic of Mg degradation in a physiological solution could result in rapid increases both in the concentration of Mg^{2+} and in the pH value in the solution, the latter being responsible for the antibacterial function of Mg. This is because bacteria can generally be alive in an environment with a pH range of 6.0-8.0, in which bacteria can maintain a cytoplasmic pH compatible with the ideal functional and structural integrity of cytoplasmic proteins.²⁶ Consequently, acidic and alkaline environments are not suitable for bacterial

survival. Probably this characteristic is responsible for a lower expression of strict anaerobic bacteria *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas endodontalis* and *Peptostreptococcus anaerobios*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

The treated groups (CaP and Mg), still had a lower expression of opportunistic species like *Klebsiella pneumoniae* and *Candida tropicalis*. These results corroborate the justification that ions may not enhance biofilm formation depending on the concentration and time of exposure to the ions.¹³ Furthermore, wettability characteristics and crystalline phase of the oxide may have influenced this result. A correlation can be attributed among the chemical composition of the oxide, the formation of the anatase phase and wettability with surface coating by biofilm, since the group treated with Mg^{2+} , presented the anatase phase and a smaller contact angle, and had lower expression of some bacterial species identified in this study. Hydrophilic surfaces are highly desirable in implant dentistry because they make it difficult for bacteria to adhere to the surface and, consequently, reduce biofilm formation,¹⁴ in addition to optimizing osseointegration. The total microbial count was lower in the Mg group, which is probably due to a higher surface wettability and the ability of Mg^{2+} to change the environment to alkaline, making it difficult for bacteria to survive.

It is known that bacterial fixation and aggregation are influenced by calcium and magnesium. Care must be taken to analyze the other factors that interfere in the process such as, cation concentration and specificity, surface hydrophobicity, roughness, and crystalline phase, among others. Some authors suggest that the average roughness and chemical composition influence the surface wettability.¹² In our work, the TNZT alloy by itself is already hydrophilic as it presents a contact angle smaller than 90°, but its contact angles were even smaller with the proposed treatments, and its roughness was considerably higher.

The Ra and Sz values of the CaP and Mg groups showed statistically higher values than those of the C group. The other test groups were considered minimally rough (Ra 0.5-1µm) and the C group was considered smooth (<0.5µm).²⁷ Even on minimally rough surfaces, there are reports of a positive correlation between increased minimal roughness and osseointegration, as demonstrated by Park et al.²⁸ They compared turned implants to three different groups of oxidized implants. Turned implants had a Ra of 0.54 µm, oxidized implants in group 1 had an Ra of 0.68 µm, oxidized group 2 had a Ra of 0.80 µm, and oxidized implants in group 3 had a Ra of 0.88 µm. After 6 weeks in rabbit bone, group 3 oxidized implants demonstrated significantly more bone-to-implant contact and higher removal torque than the other groups of implants. Sul et al.^{29,30} evaluated electrolytes that changed the chemical composition and topography containing P, S, Ca and Mg.

Chemically modified implants demonstrated greater removal torque and more bone-implant contact than controls, especially surfaces reinforced with Ca and Mg, despite the Ra/Sa values being similar to the control group. This suggests that minimal roughness can interfere with biological processes, and theoretically rougher surfaces, while having a larger area available for bone-implant contact, also have a larger area available for microbial adhesion. However, it is not possible to evaluate a single parameter separately, all surface characteristics that may influence these processes must be evaluated, and the bacteria assessed in the study is probably more sensitive to surface chemistry than to roughness.

Oliveira et al.²¹ observed that chemical modification of surfaces with the addition of Mg in the electrolyte with CaP increased the level of rutile in the oxide layer, probably due to

an increase in the conductivity of the electrolyte. In this work, as the processes were performed separately, the conductivity was probably similar and only the anatase phase was expressed in both groups. The anatase phase is known for characteristics that can improve the hydroxyapatite growth process.³¹ Recent studies have pointed to a reduction in biofilm formation on anatase surfaces,^{12,32} but the exact mechanism related to these results is not known.

Therefore, the role of cations in biofilm formation is multifactorial. It is believed that the presence of calcium and magnesium affects the initial fixation of bacteria. They bridge molecules, modify cell surface adhesins and reduce apparent surface charge and surface potential. In contrast, the role of divalent cations in the physiological functions of bacterial biofilms is reflected by electrolyte composition, such as cation concentration and cation type, as well as bacterial species and strains. Therefore, if titanium surfaces are attractive to bacteria (surface charge, roughness, crystalline phase and hydrophobicity), strategies such as functionalization of implant surfaces must be changed in order to inhibit adhesion and prevent infection.

This study, however, does not simulate the insertion of implants in the recipient bed, where there are specific conditions such as friction between the implant and the bone, and the presence of hundreds of microorganisms present in the oral environment. Additional research validating the capacity of two treatment protocols developed in coating dental implants, according to the degree of attachment to the substrate and the influence of two treatments on the process of microbial colonization and osseointegration can help to understand the relationship between implants and the development of biofilms, and the success and long-term implants survival

CONCLUSION

Despite the limitations of this study, based on the results obtained, it is possible to conclude that:

In addition to Nb, Zr and Ta, the ligand in the β phase stabilized;

PEO with sodium β -glycerophosphate and calcium acetate was able to promote micropores on the surface of the TNZT bond, and electrolyte with Mg promoted a surface with a flock appearance;

Roughness of TNZT bond was altered to minimally rough with surface modification by PEO with CaP and Mg groups;

The CaP and Mg groups show lower contact angle values, being considered more hydrophilic than the treated ligament;

A total microbial counting was significantly lower in Mg group;

The microbial profile was different for the groups investigated with less expression of *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas endodontalis*, anaerobic *Peptostreptococcus* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Mg group.

For microbiological evaluation, the Mg group shows more satisfactory and encouraging results for the preparation of dental implants.

REFERENCES

1. Karoussis IK, Brägger U, Salvi GE, Bürgin W, Lang NP, Brägger U, et al. Effect of implant design on survival and success rates of titanium oral implants: a 10-year prospective cohort study of the ITI s Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res.* 2004,1,8-17
2. Al Najam Y, Tahmaseb A, Wiryasaputra D, Wolvius E, Dharmo B. Outcomes of dental implants in young patients with congenital versus non-congenital missing teeth. *Int J Implant Dent.* 2021,1,92.
3. Miotto LN, Fais LMG, Ribeiro ALR, Vaz LG. Surface properties of Ti-35Nb-7Zr-5Ta: Effects of long-term immersion in artificial saliva and fluoride solution. *J Prosthet Dent.* 2016,1,102–11.
4. Reis BA, Fais LM, Ribeiro ALR, Vaz LG. Comparison of Ti-35Nb-7Zr-5Ta and Ti-6Al-4V hydrofluoric acid/magnesium-doped surfaces obtained by anodizing. *Heliyon.* 2020,8,4762.
5. Afonso CRM, Ferrandini PL, Ramirez AJ, Caram R. High resolution transmission electron microscopy study of the hardening mechanism through phase separation in a β -Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy for implant applications. *Acta Biomater.* 2010,4,1625–9.
6. Niinomi M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical

- applications. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008,1,30–42.
7. Hao YL, Li SJ, Sun SY, Yang R. Effect of Zr and Sn on Young's modulus and superelasticity of Ti–Nb-based alloys. *Mater Sci Eng A.* 2006,1,112–8.
 8. Tang X, Ahmed T, Rack HJ. Phase transformations in Ti–Nb–Ta and Ti–Nb–Ta–Zr alloys. *J. Mater. Sci.* 2000,5,1805–11.
 9. Ishizawa Hitoshi, Ogino Makoto. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J Biomed Mater Res.* 1995,1,65–72.
 10. Li B, Hao J, Min Y, Xin S, Guo L, He F, et al. Biological properties of nanostructured Ti incorporated with Ca, P and Ag by electrochemical method. *Mater Sci Eng C.* 2015,51,80–6.
 11. JW P, YJ K, JH J, H S. Osteoblast response to magnesium ion-incorporated nanoporous titanium oxide surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2010,11,1278–87.
 12. Kreve S, Cândido dos Reis A. Influence of the electrostatic condition of the titanium surface on bacterial adhesion: A systematic review. *J Prosthet Dent.* 2021,3,416–20.
 13. Wang T, Flint S, Palmer J. Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation. *Biofouling.* 2019,9,959–74.
 14. A A-F, LA X-F, SE R. Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010,1,196–204.
 15. Katsikogianni M, Missirlis YF, Harris L, Douglas J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cells Mater.* 2004,8,37–57.
 16. Hanaor DAH, Sorrell CC. Review of the anatase to rutile phase transformation. *J Mater Sci.* 2011,4,855–74.
 17. Liang SX, Feng XJ, Yin LX, Liu XY, Ma MZ, Liu RP. Development of a new β Ti alloy with low modulus and favorable plasticity for implant material. *Mater Sci Eng C.* 2016,61,338–43.
 18. Do Nascimento C, De Albuquerque RF, Monesi N, Candido-Silva JA. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. *J Clin Microbiol.* 2010,8,3039–40.
 19. de Castro DT, do Nascimento C, Alves OL, de Souza Santos E, Agnelli JAM, dos Reis AC. Analysis of the oral microbiome on the surface of modified dental polymers. *Arch Oral Biol.* 2018,93,107–14.
 20. Karthega M, Raman V, Rajendran N. Influence of potential on the electrochemical behaviour of β titanium alloys in Hank's solution. *Acta Biomater.* 2007,6,1019–23.
 21. Oliveira FG, Ribeiro AR, Perez G, Archanjo BS, Gouvea CP, Araújo JR, et al. Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO₂ anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium. *Appl Surf Sci.* 2015,341,1–12.
 22. Chen G, Walker SL. Role of Solution Chemistry and Ion Valence on the Adhesion Kinetics of Groundwater and Marine Bacteria. *Langmuir.* 2007,13,7162–9.

23. Lee J-H, Kim Y-G, Yong Ryu S, Lee J. Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2016,1,19267.
24. C G-T, J B, RC L, SJ C. A new approach to study attached biofilms and floating communities from *Pseudomonas aeruginosa* strains of various origins reveals diverse effects of divalent ions. *FEMS Microbiol Lett*. 2018, 14,365.
25. Robinson DA, Griffith RW, Shechtman D, Evans RB, Conzemius MG. In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomater*. 2010,5,1869–77.
26. Hallab NJ, Vermes C, Messina C, Roebuck KA, Glant TT, Jacobs JJ. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 2002,3,420–33.
27. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009,20,172–84.
28. Park Kh, Heo Sj, Koak Jy, Kim Sk, Lee Jb, Kim Sh, et al. Osseointegration of anodized titanium implants under different current voltages: a rabbit study. *J Oral Rehabil*. 2007,7,517–27.
29. Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials*. 2002,2,491–501.
30. Sul Y-T, Jeong Y, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part 1--experimental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2006,5,521–6.
31. Hilario F, Roche V, Nogueira RP, Junior AMJ. Influence of morphology and crystalline structure of TiO₂ nanotubes on their electrochemical properties and apatite-forming ability. *Electrochim Acta*. 2017,245,337–49.
32. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*. 2010,4,706–13.

3.2 Publicação 2*

Osteoblastic response to Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy incorporated with calcium, phosphate and magnesium

Bárbara Araújo dos Reis, Natalia da Ponte Leguizamón, Mariana Comminote, Joni Augusto Cirelli, Luis Geraldo Vaz.

ABSTRACT

To perform the physicochemical and morphological characterization of a Ti-35Nb-7Zr-5Ta (TNZT) alloy surface modified by anodization and to evaluate the in vitro response to osteoblastic cells cultivated on substrates, a total of 3 groups were evaluated: Group P (TNZT polished), group CaP (TNZT-HCa), and group Mg (TNZT Mg). Before and after surface anodization, physical, chemical, and morphological analyzes were performed: scanning electron microscopy (FEG-SEM), energy dispersion spectroscopy (EDS). X-ray diffraction (DRX), wettability (goniometer), roughness (rugosimeter), and film adhesion (EMIC). MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells were cultured in the discs to evaluate of morphology, adhesion, and proliferation, with Alamar Blue, MTT, FEG-SEM, and alkaline phosphatase (ALP) tests. The CaP group modified the surface morphology in the form of pores, while the Mg group modified it in the form of leaves. The contact angle was statistically smaller in the Mg group. The average roughness was higher in the CaP and Mg groups. Analysis of cells in FEG showed that the cells were able to adhere and proliferate more quickly in the treated groups. The MTT test showed no statistical differences among groups. In the Alamar blue test, the CaP group showed greater metabolic activity on day 21. In the alkaline phosphatase test, the CaP group induced greater expression of ALP on day 10. Preliminary in vitro analyzes suggested possible advantages of surface treatments, especially of the CaP group, but more specific biological tests need to be performed. For analysis and evaluation of the results obtained, mean and standard deviation were used. The results exhibited normal distribution and were analyzed using two-way analysis of variance, and two-way ANOVA followed by Tukey's test ($\alpha=0.05$)

* O artigo segue as normas do periódico Biomaterials Science no qual foi submetido

In most cases, rehabilitation with dental implants in regions with bone limitations, in most cases, involves surgery for bone reconstruction of the recipient bed. The autogenous bone graft is known as the gold standard in implant dentistry, and it involves a surgical step to remove the autogenous bone from the donor site and subsequently graft it into an insufficient recipient bone area (1). These grafts provide the necessary components for bone regeneration (osteinduction, osteoconduction, and osteogenesis), making surgery more predictable compared to the use of xenogeneic or synthetic graft materials. However, the amount of donor bone available and the additional surgery required, added to surgical morbidity, are limiting factors (2).

The use of grafts provides osseointegration of the implant in the recipient bed (1). Achieving fast and stable osseointegration is the main focus for dental and orthopedic applications, as it reduces work time and increases the reliability of long-term implant stability, thus improving the patient's quality of life (3). Short implants with physical, topographical and chemical modifications of their surfaces are studied as an alternative to graft surgeries, aiming to reduce surgical morbidity without harming the osseointegration process (4,5).

The evolution of dental implants has moved from the use of pure titanium (TiCp) to titanium alloys and simply machined surfaces (still in use), to highly modified and functionalized surfaces, with a wide range of surface properties (6). Elements such as niobium (Nb), zirconium (Zr), and tantalum (Ta) are options to make alloys that add interesting biomechanical characteristics to titanium (7). Niobium (Nb) is a β stabilizer typical of Ti alloys and has many advantages since it has the same cubic centered body structure as titanium (ccc), and a similar atomic radius, and it does not present significant biological toxicity. Previous works (8,9) showed that the addition of Nb and Ta elements to Ti alloys can considerably decrease the modulus of elasticity. Zr, on the other hand, suppresses the ω phase in quaternary alloys and it is also considered responsible for the decrease in modulus when these alloys are compared to binary alloys containing similar amounts of Nb (9–11).

In addition to making titanium alloys, it is possible to improve the interaction of the biomaterial with the host tissue by modifying the passive layer of titanium oxide (12,13). The superficial modifications of titanium are widely reported in the literature and can be obtained through different techniques (14–16). Among the surface modifying treatments applicable to titanium and its alloys, electrochemical techniques represent an attractive choice from an industrial point of view, since they promote geometrically complex structures and offer the advantage of combining economy and simplicity with versatility; in addition, they do not present a biological risk, the storage of samples does not require any complex procedure, they provide a microporous surface and increase the thickness of the oxide layer, also modifying its chemical composition by enrichment with electrolytes dissolved in the solution where the process is carried out (17).

Recent studies have demonstrated the beneficial effects of the incorporation of magnesium (Mg^{2+}) in biomaterials used in bone tissue, which significantly increased the adhesion of osteoblastic cells through signaling pathways mediated by $\alpha 5 \beta 1$ and $\beta 1$ integrins (18–20) and subsequent increase in gene expression of the type I collagen (21,22). Additionally, Mg-anodized Ticp implants showed a significant increase in removal torque

values and bone/implant contact compared to lathed, double acid etched or sandblasted surfaces (23,24). Surfaces containing calcium (Ca^{2+}) and phosphate (PO_4^{3-}) ions also favor the formation of apatite and the proliferation of osteoblasts, in addition to being involved in bone metabolism and playing important roles in mineralization, angiogenesis and homeostasis of bone tissue (25–27).

Literature studies are frequently carried out on Ti Cp or Ti-6Al-4V alloys (28–30), but currently β titanium alloys present more favorable characteristics for use in implant dentistry, and there are few reports on the interactions of these alloys and their modifications of surfaces with biological tests (8). Therefore, the objective of this work was to obtain a titanium β alloy, originating the Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy that was fused and then anodized with Ca^{2+} and PO_4^{3-} or Mg^{2+} , with a subsequent evaluation of morphology, chemical composition, diffraction of x-ray and modulus of elasticity. Then, MC3T3 cells were cultured on TNZT discs and evaluated for adhesion and proliferation with Alamar blue, MTT and alkaline phosphatase tests.

Material and method

Sample preparation

The Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy was obtained by arc casting process, in an inert atmosphere. After casting, the ingots were subjected to a heat treatment of homogenization at 1,000 °C for 8 hours (vacuum), to then be forged and machined in the form of disks (16). All discs were then submitted to finishing and polishing in a polishing machine with silicon carbide sandpaper (Norton Abrasivos do Brasil, São Paulo, SP, Brazil) with 120, 320, 600, 1,200 and 2,000 mesh grains.

The preparation of the TNZT alloy was carried out by melting in an electric arc furnace, then subjected to a heat treatment of homogenization at 1,000 °C for 8 hours (vacuum), and then forged and machined in the shape of disks ($\varnothing$ 8 mm x 2 mm) (31). Afterwards, the samples were polished in a polishing machine, submitted to chemical attack in a Kroll solution ($\text{H}_2\text{O}/\text{HF}/\text{HNO}_3$) to remove the passive oxide layer. The plasma electrolytic oxidation (PEO) method was used to perform surface treatment of samples (16).

The groups were separated according to surface modification, resulting in 3 different situations, being the P (control/polished), CaP (incorporation of Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions) and Mg (incorporation of Mg^{2+} ions) groups. The specimens were mounted in an electrochemical cell connected to a digital multimeter and an energy source (N5771A, Agilent Technologies do Brasil São Paulo, SP, Brazil), and the technique used to incorporate the ions was plasma electrolytic oxidation (PEO). Group P is composed of untreated discs. For the CaP group, the protocol for micropore formation protocol was used with incorporation of Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions, in an electrolyte composed of 0.04 mol/L of sodium β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, USA) plus 0.35 mol/L calcium acetate (Sigma-Aldrich Co, St Louis, Mo, USA). The current source was adjusted to 300V with varying electrical current intensity, starting at 2.5A, for 60 seconds (32). For the Mg group, Mg^{2+} ions were incorporated to the surface at a concentration of 0.1 mol/L (16) with a voltage of 200V, current of 2A for 60 seconds.

Surface Characterization

The topography of the samples was evaluated before and after surface treatments in a scanning electron microscope (Jeol JSM6610LV, Akishima, Tokyo, Japan) to evaluate the oxide morphology. For chemical analysis, X-ray energy dispersive (EDS) technique (INCA 250, Oxford Instruments, Concorde, New Hampshire, USA) was used in order to detect the elements present on the surface. X-ray diffraction (XRD) with copper $K\alpha$ was used to evaluate the crystal structure of all samples with speed $2^\circ/\text{min}$ (33).

The wettability of the samples was evaluated by the value of the contact angle (AC) using a goniometer (Ramé-Hart 100-00, Succasunna, NJ, USA), with drops of distilled water dispensed on the surface of the samples by a syringe of the same size of the droplet. This AC was measured after 20 seconds and repeated three times for each sample.

The mean roughness (Ra) of all samples was measured before and after the anodizing procedures, in a roughness meter (Mitutoyo SJ 400 – Mitutoyo Corporation - Japan). Three measurements were taken on each surface and the mean between readings was determined as the Ra value (μm) of each sample.

The adhesion of the film to the alloy surface was evaluated following the tensile test of metallic and calcium phosphate coatings, standard recommended by the American Society for Testing and Materials (ASTM International) (34), in which one treated sample is joined to another sample not treated with a polymeric adhesive and used the universal mechanical testing machine (EMIC DL2000) to perform the tension test with a 40kgf load cell.

The modulus of elasticity (GPa) was measured in 9 samples per group, using the impulse excitation technique, according to the ASTM E2804 standard, which consists on a non-destructive test using a 1:3 ratio cylinder. The ATCP Sonelastic equipment was used, connected to a computer with signal processing software.

The adhesion of the film to the alloy surface was evaluated following the bond test of metallic and calcium phosphate coatings, standard recommended by the American Society of Testing and Materials (ASTM International)(34). A surface-coated specimen is bonded to another smooth specimen with a polymeric adhesive and then tensioned in the Universal Mechanical Testing Machine (EMIC DL2000) to perform the bond test with a 500N load cell. It is a qualitative test that reveals the load that the weakest group supports, and suggests that the group that remains attached to the equipment supports a load greater than the value of the sample that was released.

Cell assay

Morphology and spread were evaluated by FEG-SEM. After 1, 3 and 7 days, the medium was removed and the cells were fixed with 2% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich®, USA) in pure α -MEM (Gibco®) in 0.1 mol.L⁻¹ cacodylate buffer (Sigma®), washed in phosphate buffer solution (PBS), dehydrated in a gradual series of isopropyl alcohol, dried in vacuum and, covered with 6 nm gold for analysis.

The metabolic activity of cells was evaluated by Alamar Blue and MTT tests. For the Alamar Blue test (Life Technologies, USA) MC3T3 cells were seeded (1×10^4 cell/ml) in the middle of the disks in a 24-well plates and cultured for days 1, 3, 7, 10 and 14. Briefly, the medium was aspirated and 1 mL of dye solution (10% alamarBlue and 90% culture medium) was added to each well, and cells were incubated at 37 °C for 4 h. After the incubation time,

150 μ L aliquots were collected from each sample and transferred to a 96-well plate for reading at wavelengths of 570 and 600 nm in an automatic microplate reader (ELISA) (Molecular Devices, USA). For the analysis of the results, the difference in the percentage of reduction was calculated comparing the test groups to the positive control group ($C+$ = cells cultivated in the plastic of the culture plate). For the MTT test, cells were washed with saline solution – PBS 1x, and kept in contact with MTT salt for 3 hours. Then, they were washed with acidified isopropyl alcohol to solubilize the formazan. Optical density was measured using a spectrophotometer with a 570 nm filter (Asys-UVM 340, Biochrom – MikroWin 2000). Tests were performed in triplicate and repeated three times in 24, 48 and 72 h.

Osteoblastic differentiation was assessed by alkaline phosphatase (ALP). The cells were immersed in a sodium lauryl sulfate solution (1mg/ml) for 30 minutes, and then the commercial Alkaline Phosphatase Kit (Labtest, Lagoa Santa, MG) was used, according to the manufacturer's instructions. Absorbance reading was performed in a spectrophotometer (Asys-UVM 340, Biochrom – MikroWin 2000) at a wavelength of 590 nm.

For analysis and evaluation of the results obtained, mean and standard deviation were used.

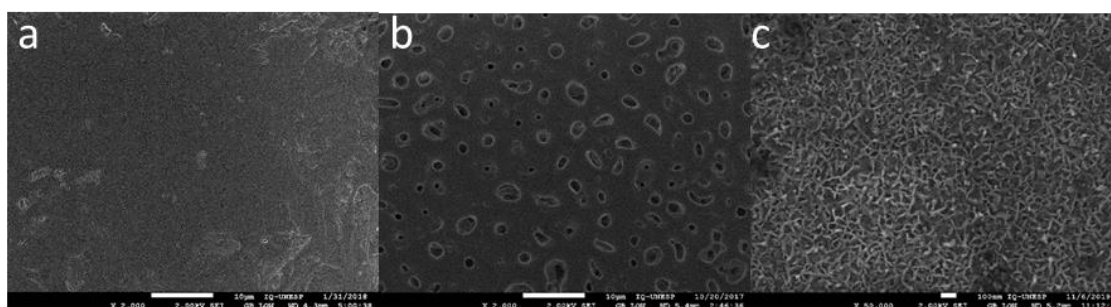
The results of Ra and ELS exhibited normal distribution and were analyzed two-way ANOVA followed by Tukey's test ($\alpha=0.05$)

Results

Characterization of samples

The P group had a smooth surface with grooves compatible with the sandpaper used for polishing (Figure 1a), the CaP group resulted in the formation of surfaces with pore characteristics (Figure 1b) and the Mg group, showed surfaces with flake characteristics (Figure 1c)

Figure 1a: Polished TNZT; 1b: CaP pores in TNZT; 1c: Mg in TNZT



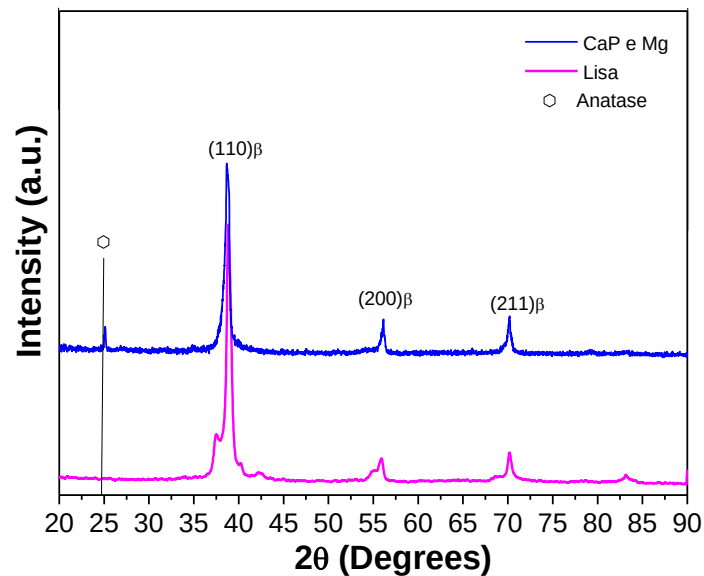
The EDS analysis showed the incorporation of Ca^{2+} and PO_4^{3-} in the CaP group and of Mg^{2+} in the oxide layer of the Mg group, and showed no contamination after the anodizing process (Table 1).

Table 1: EDS of study samples

Element	P	CaP	Mg
Ti	52,98	28,43	19,24
Nb	36,06	8,81	6,46
Zr	6,23	1,52	1,47
Ta	4,73	0,63	0,51
Ca		8,15	
P		4,01	
Mg			12,36
O		44,45	58,96

In the XRD analysis, only the β -phase of titanium was detected in the TNZT alloy, and after anodizing the CaP and Mg groups, the anatase phase was identified. (Figure 2).

Figure 2: XRD analysis of smooth samples and CaP and Mg groups with a predominance of the β phase



Significant differences were obtained as a function of anodizing ($p < 0.0001$). For analysis and evaluation of the results obtained, mean and standard deviation were used. The results of Ra and Acs exhibited normal distribution and were analyzed with two-way ANOVA followed by Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

The mean roughness of the samples from the treated groups was statistically higher than that of the P group, with no statistical difference between CaP and Mg (Table 3). In general, the mean square values (Sz) are in agreement with the mean roughness values, demonstrating the good homogeneity of the samples. Contact angle measurements showed that all groups present values below 90° using distilled water, thus suggesting a qualitatively hydrophilic character ($\theta > 90^\circ$). There was a statistically significant difference in the ACs

values of the Mg group with CaP and P (Mg= 41.4 °, CaP= 50.4 °, P=56.6 °, respectively). (Table 2). The alloy's modulus of elasticity was 64GPa.

The measured adhesion strength or cohesion value represents the weakest part of the system, whether in the cladding or an interface. A 500N load cell was used and it is capable of exerting up to 400N in the system. The breakage occurred on the surface of the sample not treated with 310N, in all groups, which indicates that the adhesion strength of this film is greater than 310N.

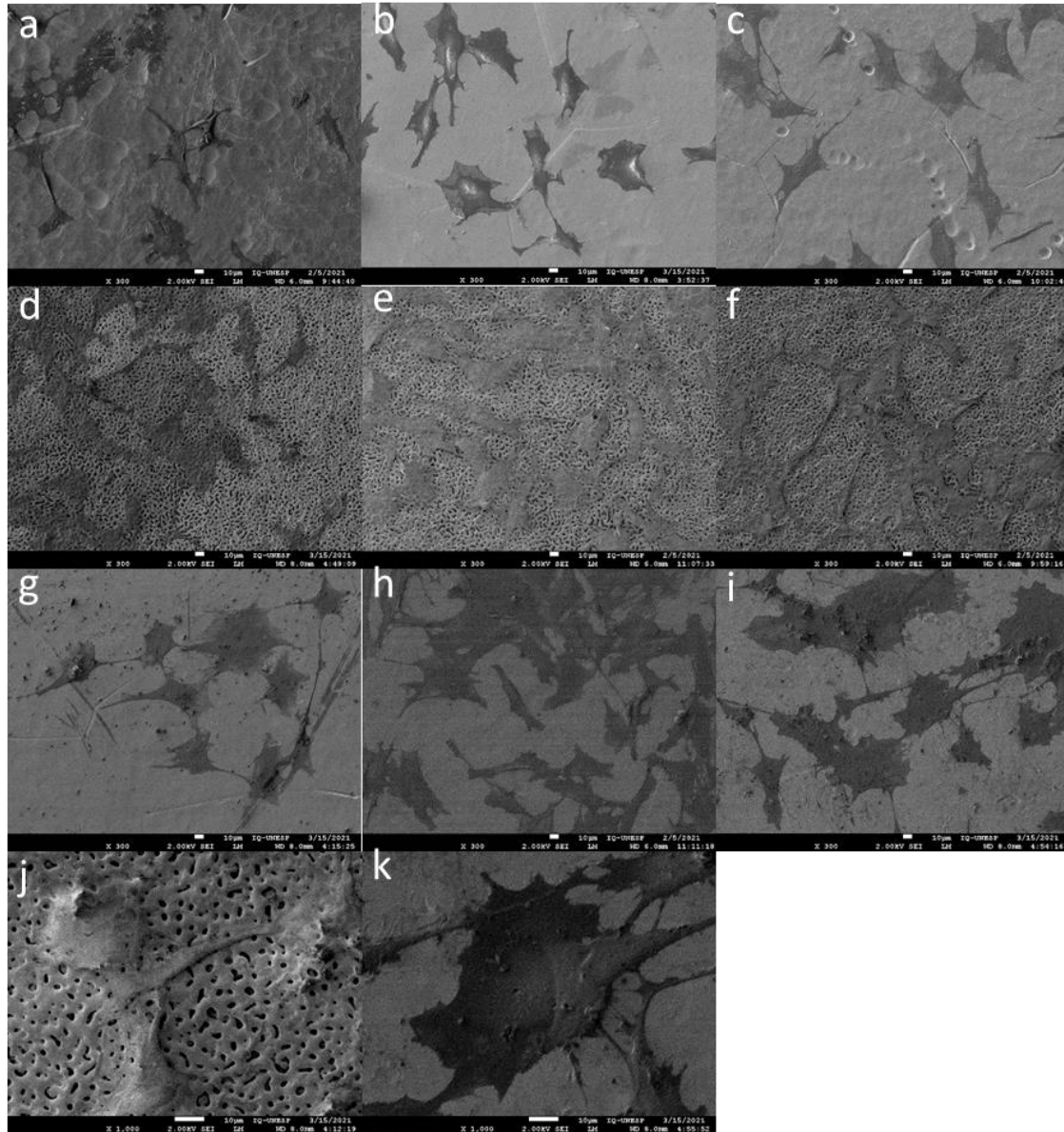
Table 2: Linear surface roughness (Ra), area roughness (Rz), wettability (CA) of the study groups

Groups	Ra(μm)	Sz(μm)	Ca($^{\circ}$)
P	0,26($\pm$ 0,3) ^B	2,30 $\pm$ 0,4 ^B	55,6($\pm$ 2,9) ^B
CaP	0,54($\pm$ 0,8) ^A	4,09 $\pm$ 0,4 ^A	50,4($\pm$ 4,5) ^B
Mg	0,61($\pm$ 0,3) ^A	4,66 $\pm$ 0,3 ^A	41,4($\pm$ 3,1) ^A

Cell assay

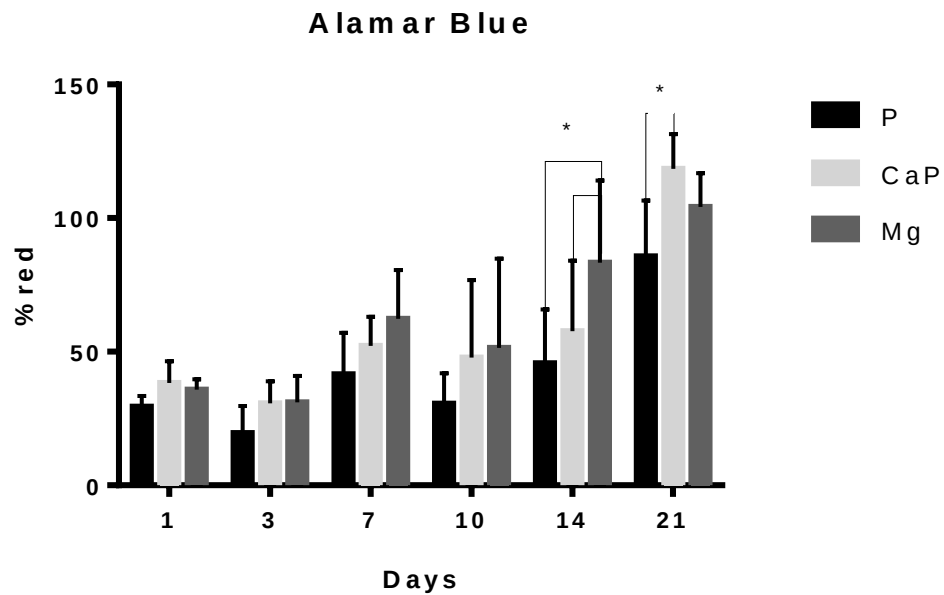
In FEG analysis, osteoblasts adhered and proliferated in all groups, and showed filopodia in CaP and Mg groups, confirming maturation especially after 1 day. Interestingly, in group P, the connections between cells were smaller and linearly projected following the polishing grooves on the surface, while in the CaP and Mg samples the filopodias occurred increasingly with the days of culture in the whole sample as shown in Figure 3.

Figure 3: MCT3-E1 cells on samples. 3A: MC3T3 on P day 1; 3B: MC3T3 on P day 3; 3C: MC3T3 on P day 7; 3D MC3T3 on CaP day 1; 3E: MC3T3 on CaP day 3; 3F: MC3T3 on CaP day 7; 3G: MC3T3 on Mg day 1; 3H: MC3T3 on Mg day 3; 3I: MC3T3 on Mg day 7; 3J: Presence of phyllopods in CaP in greater increase; 3k: Presence of phyllopods in Mg in greater increase



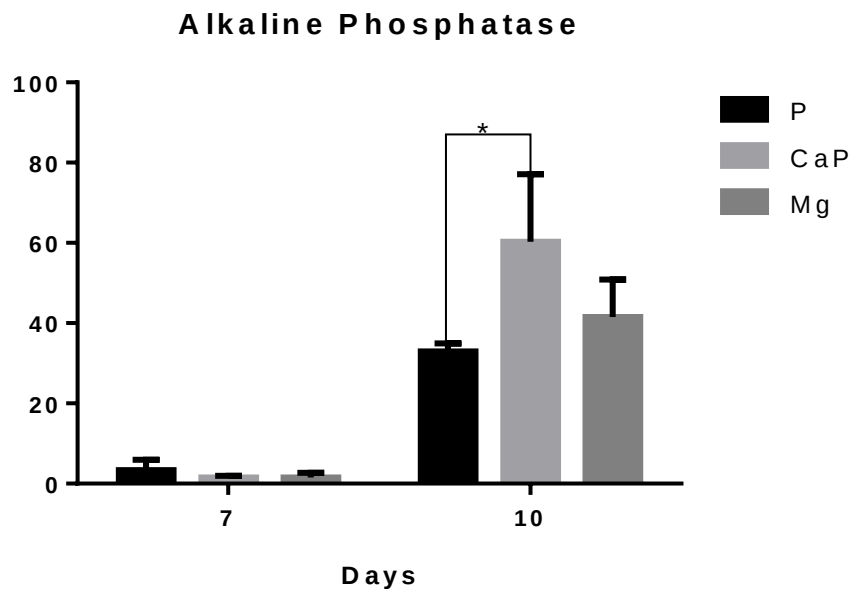
The Alamar blue test represents the percentage reduction of Alamar Blue in the culture medium compared to the positive control - cells grown on the plastic plate. This assay analyzes metabolic activity and cell growth. In the intergroup analysis, a trend towards greater metabolic activity was observed in the CaP and Mg groups in all periods, and on day 21 the CaP group showed greater activity. In the intragroup analysis, all groups showed an increase in the percentage of reduction over the periods, except on day 10 (graph 1).

Graph 1: Alamar Blue Test on days 1, 3, 7, 10, 14 and 21.



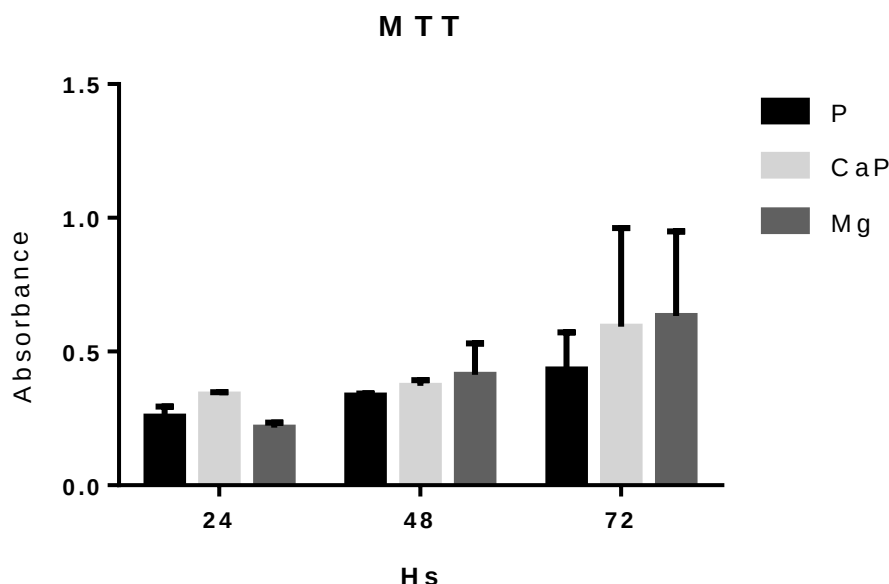
In experiments with MC3T3, cell differentiation can be assessed by osteoblast markers such as the ALP assay during maturation. The ALP expression in all groups had a considerable increase in 10 days of culture (graph 2), and the group with the highest expression values was CaP, with a statistical difference when compared to the P group.

Graph 2: Alkaline Phosphatase Activity (ALP) on days 7 and 10



The proliferation of MC3T3-E1 cells was evaluated over 3 different time periods (24, 48 and 72hs) by the MTT test. The graph shows the density of formazan produced by MC3T3-E1 cells on different TNZT surfaces. After 24 hours of adhesion, cell density on treated and polished surfaces showed no significant difference ($P > 0.05$). In the following periods (48 and 72 hours), the density of all groups increased significantly, but there was either no significant difference among the three groups.

Graph 3: MTT on hours 24, 48 and 72



The results showed that in the smooth TNZT alloy, group P, there is growth of MC3T3 cells, but with the FEG and Alamar Blue tests it was possible to identify that the surface treatments accelerated and intensified the evaluated responses.

Discussion

Factors such as chemical composition of the biomaterial, hydrophilicity, crystalline phase, nanotopography and charges can be modified on surfaces or titanium alloys to favor osteoblastic activity. In the present study, the β titanium alloy TNZT and the anodizing technique for surface modification with the addition of ions with osteogenic potential were used and we evaluated the response of MCT3-E1 cells cultivated on these surfaces.

Hydroxyapatite accounts for approximately 70% of the weight of bone components, and due to their bone structural similarity, calcium and phosphate have been widely applied as doping ions to implant surfaces (15,25), but recent studies have also emphasized the importance of magnesium, as it helps to form bone apatite and favors greater adhesion and proliferation of osteoblasts (19,20). The results of the present study are in agreement with previous studies that showed that the incorporation of Ca^{2+} , PO_4^{3-} and Mg^{2+} to the TNZT alloy can enhance cell adhesion, proliferation and differentiation.

Research into β titanium alloys for implant manufacturing has grown exponentially. Okazaki et al 2001(35) studied the corrosive behavior with alloys containing Al and V and TNZT alloys, and after in vitro wear tests on the alloy, verified a low cell growth in media containing aluminum and vanadium compared to media free of Al and V, which indicates a cytotoxic effect of aluminum and vanadium on human cells. Karthega et al 2007 (7), suggests that the combination of non-allergic / toxic β stabilizing elements, such as those used in this study (Zr, Nb, Ta), are promising due to their lower Young's modulus (about 60 GPa) and

excellent long-term stability against corrosion in biological environments due to other resulting surface oxides such as Nb₂O₅, ZrO₂ and Ta₂O₅.

In addition, topographical and chemical modification of the implant surface is also important for long-term implant survival. The formation of a porous surface induces an increase in the surface area of biomaterials and consequently improves mechanical retention. Regarding surface chemistry, the incorporation of osteoconductive elements, which are elements present in the natural bone composition such as Ca, P and Mg, allows a strong chemical bond between the material and bone tissue. Surface texturing is used to increase cell attachment and subsequent cell proliferation (36,37).

Regarding the CaP group, it is possible to notice that the PEO process with β -GPCa promotes the incorporation of Ca²⁺ and PO₄³⁻ in the oxide layer as shown in Table 1. However, these samples did not reveal a Ca/P ratio close to that of natural hydroxyapatite of 1.67 (38). This electrolyte promoted the formation of pores by PEO, a competitive process involved and degradation that determines the doping efficiency. The oxide layer breakdown is characterized by an increase in the surface electric field that generates sparks and increases local temperature, which are the phenomena responsible for the doping of the oxide layer and are directly dependent on the composition and/or concentration of the electrolyte (27).

Before PEO, the alloy has a β bcc phase main structure. Later, when Ca²⁺, PO₄³⁻ and Mg²⁺ are incorporated into the samples, a new phase, corresponding to anatase, is identified in the samples. As mentioned earlier, the PEO process is characterized by an increase in the surface electric field that generates sparks and a local increase in temperature.

The increase in local temperature allows a local crystallization of the oxide layer. Clearly, the addition of the ions increases process reactivity by increasing the local temperature. Alves et al 2021(27) found a similar result with Ca²⁺, PO₄³⁻ and Mg²⁺ doping; however, with the electrolyte containing Mg²⁺ the oxide layer remained amorphous, probably because it used a lower current value and for a shorter time than suggested in our study. In the study by Kim et al 2006 (26) the modification of the oxide layer by anodizing with β glycerophosphate plus calcium acetate also resulted in the formation of porous oxide, with the oxide structure being observed anatase. When it comes to metallic alloys, a high degree of heterogeneity in the morphology and chemistry of the structures is observed due to the dissolution of some of the elements of the alloy used (6). In this work, the surface modification of the CaP and Mg group formed an anatase-type oxide layer after anodizing the samples, which has the characteristic of improving the hydroxyapatite growth process (12), being favorable in a material for use in tissue bone.

Although coated implants have advantages, they are commonly questioned for not having the film stable enough at the time of implant installation. Calcium phosphates, despite their biologically favorable properties, do not withstand large orthopedic and dental loads, and for this reason they are more used in situations without load, such as filling bone defects and maxillofacial reconstructions (21). One way to overcome the problems related to the unfavorable mechanical properties of HAp is to use it as a coating for metallic surfaces, using a stable method. The metallic substrate acts as the load-bearing material, and the HAp coating provides a bioactive surface. Anodic oxidation is able to promote an HAp coating on titanium surfaces, generating a resistant and stable oxide layer in order to facilitate adhesion, orientation and bone formation (39).

In the adhesion test performed in this study, the value of the adhesion strength or cohesion measured represents the weakest part of the system, either in the coating or in an interface (34). The 500N load cell used broke the union of the samples to the system with a maximum force of 310N, and in all groups the break occurred on the surface of the untreated sample. The test has its limitations as it is not faithful to clinical practice, as it is not possible to represent the friction resistance to bone in this test. But considering that the maximum load used in the insertion of an implant is 60N, this result suggests that the adhesion strength of the film to the substrate is high, reducing the possibility of its detachment at the time of implant insertion. Microscopically 60N per area of 1mm², has a voltage of 60MPa, so a load of 310N in a part area of 10mm² generates a voltage of 3.10MPa. As such, the film will support the pullout load and will likely just be scratched.

From a clinical point of view, the main objective for the development of implant surface modifications is to promote faster, more stable and stronger osseointegration, to achieve better stability during the healing process, and consequently to improve clinical performance in poor quality conditions and bone quantity (40). Therefore, the results of the CaP and Mg groups demonstrated in the FEG and Alamar Blue tests suggest that these surface modifications can influence the intensity of bone response when compared to the P group, shortening the healing time. In order for osteogenic cells to carry out the cascade of wound healing - proliferation, differentiation and tissue maturation - the cells need to adhere and spread through a substrate first (41).

The first stage in cell proliferation is the centrifugal growth of processes similar to microvilli that elongate into phyllopods (42). Philopods are elongated microvilli that affect cell-cell or cell-substrate adhesion (43). The presence of these phyllopods suggests cell proliferation, especially after 1 day in the CaP and Mg groups. Interestingly, in the polished groups, the extensions between the cells were small and following the polishing grooves on the surface, while in the samples of CaP and Mg, filopodias occurred in an increasing way with the days of culture in the whole sample, corroborating the works that suggest that substrates modified with CaP and Mg accelerate cell proliferation (13). The close contacts made by the advance of the phyllopods are followed by extensive "closing" of the cytoplasm, spreading like a fine web among the phyllopods. The progression of the cytoplasmic web occurs with cell differentiation, resulting in the flattening of the cell (42), as seen in Fig. 1f and Fig. 1i.

The roughness in CaP and Mg was also statistically higher when compared to the P group, which can also be related to greater cell adhesion and proliferation in the treated groups, while in P cells had difficulty in proliferating and emitting cytoplasmic prolongations, as seen in Figure 1c. The differentiation, proliferation and production of bone matrix, as well as the production of local growth factors and cytokines, can be affected by surface roughness and wettability (39). Apparently, there was no relationship between average roughness and wettability. According to the literature (44), at these roughness levels, the influence on wettability is not clear.

There are studies that use the AlamarBlue assay to assess the cytotoxicity of alloys comparing cpTi (45). In the present study, the assessment was made using the value relative to the metabolic rate of cells cultured in polished samples at each time point as 100%. The values expressed for the other groups are higher than the P group, which seems to be an

effective approach to increase the osteoconductivity of implants. The decrease in Alamar Blue reduction values at 10 days coincides with the increase in ALP expression at day 10.

ALP is an expression factor of the initial differentiation period and tends to decrease its expression after the second week (46). The decrease in Alamar Blue reduction values on day 10 and the increase in ALP expression confirm the reciprocal and functionally coupled relationship between the decline in proliferative activity and the subsequent induction of genes associated with matrix maturation and mineralization (47). As CaP showed higher statistical values of ALP expression than the other groups, this surface treatment can more quickly favor a differentiation of cells into osteoblasts *in vivo*.

The osseointegration of dental implants depends on direct contact between the bone and the metallic surface. Short-term (migration and anchorage) and long-term (matrix differentiation and expression) *in vitro* cellular responses play an important role in the understanding of cell expression on titanium surfaces and titanium alloys. Physical, chemical, mechanical and topographical properties of the implant surface directly affect cellular responses, including cell adhesion and growth.

Conclusion

The addition of Nb, Zr and Ta stabilized the alloy in the β phase;

PEO with sodium β glycerophosphate and calcium acetate promoted micropores

on the surface of the TNZT alloy, and electrolyte with Mg promoted a flaky surface;

TNZT alloy roughness was changed to minimally rough with surface modification by PEO with CaP and Mg;

The CaP and Mg groups had lower contact angle values, being considered more hydrophilic than the untreated alloy;

The CaP group was the substrate that most favored the Alamar Blue and Alkaline Phosphatase tests, so for an *in vitro* analysis with osteoblastic cells, this group showed more satisfactory and encouraging results for the manufacture of dental implants.

References

1. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 2009;24 Suppl:237–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885448>
2. Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, et al. Long Bone Defect Models for Tissue Engineering Applications: Criteria for Choice. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2010 Apr;16(2):263–71. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2009.0224>
3. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* [Internet]. 11(5):391–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922731>
4. Dds TB, Reza A, Dds R, Dds AG. Comparing short dental implant and standard dental implant in terms of marginal bone level changes : A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. 2019;(April):1–17.
5. Study CS, Misch CE, Steigenga J, Barboza E, Misch-dietsh F, Cianciola LJ, et al. Short Dental Implants in Posterior Partial. 2006;77(8).
6. Tsuchiya H, Macak JM, Ghicov A, Tang YC, Fujimoto S, Niinomi M, et al. Nanotube oxide coating on Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy prepared by self-organizing anodization. *Electrochim Acta*. 2006;52(1):94–101.
7. Karthega M, Raman V, Rajendran N. Influence of potential on the electrochemical behaviour of β titanium alloys in Hank's solution. *Acta Biomater* [Internet]. 2007 Nov;3(6):1019–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706107000323>
8. Afonso CRM, Ferrandini PL, Ramirez AJ, Caram R. High resolution transmission electron microscopy study of the hardening mechanism through phase separation in a β -Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy for implant applications. *Acta Biomater* [Internet]. 2010 Apr;6(4):1625–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706109005066>
9. Niinomi M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2008;1(1):30–42.
10. Hao YL, Li SJ, Sun SY, Yang R. Effect of Zr and Sn on Young's modulus and superelasticity of Ti-Nb-based alloys. *Mater Sci Eng A* [Internet]. 2006 Dec;441(1–2):112–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921509306020351>
11. Tang X, Ahmed T, Rack HJ. Phase transformations in Ti-Nb-Ta and Ti-Nb-Ta-Zr alloys. 2000;5:1805–11.
12. Hilario F, Roche V, Nogueira RP, Junior AMJ. Influence of morphology and crystalline structure of TiO₂ nanotubes on their electrochemical properties and apatite-forming ability. *Electrochim Acta* [Internet]. 2017;245:337–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2017.05.160>
13. Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, et al. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res* [Internet]. 1996 Sep;32(1):55–63. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199609\)32:1%3C55::AID-JBM7%3E3.0.CO;2-O](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-4636(199609)32:1%3C55::AID-JBM7%3E3.0.CO;2-O)

14. Oliveira FG, Ribeiro AR, Perez G, Archanjo BS, Gouvea CP, Araújo JR, et al. Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO₂ anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium. *Appl Surf Sci.* 2015;341:1–12.
15. Sul YT. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: Special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. *Biomaterials.* 2003;24(22):3893–907.
16. Reis BA, Fais LM, Ribeiro ALR, Vaz LG. Comparison of Ti–35Nb–7Zr–5Ta and Ti–6Al–4V hydrofluoric acid/magnesium-doped surfaces obtained by anodizing. *Heliyon* [Internet]. 2020 Aug;6(8):e04762. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020316054>
17. Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, et al. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res.* 2002;62(2):175–84.
18. Park J, Jang J. Osteoblast response to magnesium ion-incorporated nanoporous titanium oxide surfaces. 2010;1278–87.
19. Kim B-S, Kim JS, Park YM, Choi B-Y, Lee J. Mg ion implantation on SLA-treated titanium surface and its effects on the behavior of mesenchymal stem cell. *Mater Sci Eng C.* 2013 Apr;33(3):1554–60.
20. Jiang X, Wang G, Li J, Zhang W, Xu L, Pan H, et al. Magnesium ion implantation on a micro/nanostructured titanium surface promotes its bioactivity and osteogenic differentiation function. *Int J Nanomedicine.* 2014 May;2387.
21. Zreiqat H, Valenzuela SM, Nissan B Ben, Roest R, Knabe C, Radlanski RJ, et al. The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signalling pathways in human osteoblasts. *Biomaterials* [Internet]. 2005 Dec;26(36):7579–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205004126>
22. Galli S, Andersson M, Jinno Y, Karlsson J, He W, Xue Y, et al. Magnesium release from mesoporous carriers on endosseous implants does not influence bone maturation at 6 weeks in rabbit bone. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2016;1–8.
23. Sul Y-T, Johansson C, Albrektsson T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. *Int J Prosthodont* [Internet]. 19(4):319–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16900812>
24. Sul Y-T, Johansson CB, Albrektsson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 17(5):625–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381062>
25. Li B, Hao J, Min Y, Xin S, Guo L, He F, et al. Biological properties of nanostructured Ti incorporated with Ca, P and Ag by electrochemical method. *Mater Sci Eng C.* 2015;51:80–6.
26. Kim K-H, Kwon T-Y, Kim S-Y, Kang I-K, Kim S, Yang Y, et al. Preparation and Characterization of Anodized Titanium Surfaces and Their Effect on Osteoblast Responses. *J Oral Implantol* [Internet]. 2006 Feb 1;32(1):8–13. Available from: <https://meridian.allenpress.com/joi/article/32/1/8/2036/Preparation-and-Characterization-of-Anodized>

27. Almeida Alves CF, Fialho L, Marques SM, Pires S, Rico P, Palacio C, et al. MC3T3-E1 cell response to microporous tantalum oxide surfaces enriched with Ca, P and Mg. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2021 May;124:112008. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493121001478>
28. Das K, Bose S, Bandyopadhyay A, Karandikar B, Gibbins BL. Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2008;87(2):455–60.
29. Huo K, Gao B, Fu J, Zhao L. Fabrication, modification, and biomedical applications of anodized TiO₂ nanotube arrays. 2014;(September 2019).
30. Li Y, Yu H, Zhang C, Song W, Li G, Shao Z, et al. Effect of water and annealing temperature of anodized TiO₂ nanotubes on hydrogen production in photoelectrochemical cell. *Electrochim Acta*. 2013;107:313–9.
31. Miotto LN, Fais LMG, Ribeiro ALR, Vaz LG. Surface properties of Ti-35Nb-7Zr-5Ta: Effects of long-term immersion in artificial saliva and fluoride solution. *J Prosthet Dent*. 2016;116(1):102–11.
32. Alves AC, Oliveira F, Wenger F, Ponthiaux P, Celis JP, Rocha LA. Tribocorrosion behaviour of anodic treated titanium surfaces intended for dental implants. *J Phys D Appl Phys*. 2013;46(40).
33. Liang SX, Feng XJ, Yin LX, Liu XY, Ma MZ, Liu RP. Development of a new β Ti alloy with low modulus and favorable plasticity for implant material. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2016 Apr;61:338–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115306822>
34. ASTM International. Standard Test Method for Shear Testing of Calcium Phosphate Coatings and Metallic. In: West Conshohocken, editor. *Tension Testing of Calcium Phosphate and Metallic Coatings*. United States; 2017. p. 19428–2959.
35. Okazaki Y. A New Ti–15Zr–4Nb–4Ta alloy for medical applications. *Curr Opin Solid State Mater Sci* [Internet]. 2001 Jan;5(1):45–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359028600000255>
36. C G-T, J B, RC L, SJ C. A new approach to study attached biofilms and floating communities from *Pseudomonas aeruginosa* strains of various origins reveals diverse effects of divalent ions. *FEMS Microbiol Lett*. 2018 Jul;365(14).
37. Ishizawa Hitoshi, Ogino Makoto. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(1):65–72.
38. Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – A review. *Acta Biomater* [Internet]. 2014 Feb;10(2):557–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113005539>
39. Wang Y, Lei T, Jiang B, Guo L. Growth, microstructure and mechanical properties of microarc oxidation coatings on titanium alloy in phosphate-containing solution. *Appl Surf Sci*. 2004;233(1–4):258–67.
40. Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, Fernández-Barbero JE, O’Valle F, Jódar-Reyes AB, Ortega-Vinuesa JL, et al. Role of wettability and nanoroughness on interactions between osteoblast and modified silicon surfaces. *Acta Biomater* [Internet]. 2011 Feb;7(2):771–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706110003946>

41. Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature* [Internet]. 1978 Jun;273(5661):345–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/273345a0>
42. Weiss L, Harlos JP. Some speculations on the rate of adhesion of cells to coverslips. *J Theor Biol* [Internet]. 1972 Oct;37(1):169–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022519372901233>
43. Rajaraman R, Rounds DE, Yen SPS, Rembaum A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp Cell Res*. 1974;88(2):327–39.
44. Van Oss C., Good R., Chaudhury M. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 1986 Jun;111(2):378–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002197978690041X>
45. Horev-Azaria L, Kirkpatrick CJ, Korenstein R, Marche PN, Maimon O, Ponti J, et al. Predictive Toxicology of Cobalt Nanoparticles and Ions: Comparative In Vitro Study of Different Cellular Models Using Methods of Knowledge Discovery from Data. *Toxicol Sci* [Internet]. 2011 Aug;122(2):489–501. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfr124>
46. Bang S-M, Moon H-J, Kwon Y-D, Yoo J-Y, Pae A, Kwon IK. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2014 Jul;25(7):831–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/clr.12146>
47. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* [Internet]. 1990 Jun;143(3):420–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.1041430304>

4 CONCLUSÃO

Os tratamentos eletroquímicos propostos promoveram modificações químicas, físicas e topográficas das propriedades da liga de titânio interessantes para uso como implante dental. Ambos tratamentos aumentaram a rugosidade do material e tiveram comportamento hidrofílico.

O grupo CaP modificou a morfologia da superfície em forma de poros, enquanto o Mg modificou em forma de folhas. O ângulo de contato foi estatisticamente menor no grupo Mg e a rugosidade média foi maior nos grupos CaP e Mg.

A contagem microbiana total foi significativamente menor no grupo Mg

O perfil microbiano foi diferente para os grupos investigados com menor expressão das bactérias *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas endodontalis* e *Peptostreptococcus anaerobius* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no grupo Mg

Para avaliação microbiológica, o grupo Mg apresentou resultados mais satisfatórios e animadores para confecção de implantes dentários.

As células conseguiram aderir e proliferar mais rapidamente nos grupos tratados. No teste alamar blue o grupo CaP apresentou maior atividade metabólica no dia 21. No teste de fosfatase alcalina, o grupo CaP induziu maior expressão de ALP no dia 10. As análises preliminares in vitro sugeriram possíveis vantagens dos tratamentos de superfície, especialmente do grupo CaP,

O grupo CaP parece favorecer mais processos de osseointegração quando comparado ao grupo Mg, no entanto no grupo Mg menos bactérias foram identificadas. Mais estudos precisam ser realizados para entender a relevância de cada um destes tratamentos em modelos animais e também testar ambos tratamentos juntos em um mesmo material.

REFERÊNCIAS*

1. Brånemark P-I, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson Å. Intraosseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental Studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81–100.
2. Kuromoto NK, Simão RA, Soares GA. Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. *Mater Charact*. 2007;58(2):114–21.
3. Rosales-Leal JI, Rodríguez-Valverde MA, Mazzaglia G, Ramón-Torregrosa PJ, Díaz-Rodríguez L, García-Martínez O, et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2010;365(1–3):222–9.
4. Letic-Gavrilovic A, Scandurra R, Abe K. Genetic potential of interfacial guided osteogenesis in implant devices. *Dent Mater J*. 2000;19(2):99–132.
5. Mohamed Abdel Hady, Keita Hinoshita MM. General approach to phase stability and elastic properties of β -type Ti-alloys using electronic parameters. *Scr Mater*. 2006;55(5):477–80.
6. Sharma A, McQuillan AJ, A Sharma L, Waddell JN, Shibata Y, Duncan WJ. Spark anodization of titanium–zirconium alloy: surface characterization and bioactivity assessment. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(8):1–11.
7. Ribeiro ALR, Hammer P, Vaz LG, Rocha LA. Are new TiNbZr alloys potential substitutes of the Ti6Al4V alloy for dental applications? An electrochemical corrosion study. *Biomed Mater*. 2013;8(6):065005.
8. Bai Y, Deng Y, Zheng Y, Li Y, Zhang R, Lv Y, et al. Characterization, corrosion behavior, cellular response and in vivo bone tissue compatibility of titanium-niobium alloy with low Young's modulus. *Mater Sci Eng C*. 2016;59:565–76.
9. Geetha M, Kamachi Mudali U, Gogia AK, Asokamani R, Raj B. Influence of microstructure and alloying elements on corrosion behavior of Ti-13Nb-13Zr alloy. *Corros Sci*. 2004;46(4):877–92.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

10. Rao S, Ushida T, Tateishi T, Okazaki Y AS. Effect of Ti, Al, and V ions on the relative growth rate of fibroblasts (L929) and osteoblasts (MC3T3-E1) cells. *Biomed Mater.* 1996;6(2):79–86.
11. Long M, Rack H. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials.* 1998;19(18):1621–39.
12. Reis BA, Fais LM, Ribeiro ALR, Vaz LG. Comparison of Ti–35Nb–7Zr–5Ta and Ti–6Al–4V hydrofluoric acid/magnesium-doped surfaces obtained by anodizing. *Heliyon.* 2020;6(8):e04762.
13. Gilbert JL. Step-polarization impedance spectroscopy of implant alloys in physiologic solutions. *J Biomed Mater Res.* 1998;40(2):233–43.
14. Choi MG, Koh HS, Kluess D, O'Connor D, Mathur A, Truskey GA, et al. Effects of titanium particle size on osteoblast functions in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(12):4578–83.
15. Ribeiro ALR, Junior RC, Cardoso FF, Filho RBF, Vaz LG. Mechanical, physical, and chemical characterization of Ti-35Nb-5Zr and Ti-35Nb-10Zr casting alloys. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(8):1629–36.
16. Bidaux J-E, Pasquier R, Rodriguez-Arbaizar M, Girard H, Carreño-Morelli E. Low elastic modulus Ti–17Nb processed by powder injection moulding and post-sintering heat treatments. *Powder Metall.* 2014;15;57(5):320–3.
17. Hao YL, Li SJ, Sun SY, Yang R. Effect of Zr and Sn on Young's modulus and superelasticity of Ti–Nb-based alloys. *Mater Sci Eng A.* 2006;441(1–2):112–8.
18. FG Evans. The mechanical properties of bone. *Artif Limbs.* 1969;13(1):37–48.
19. Sul Y-T, Jeong Y, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part 1--experimental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(5):521–6.
20. Laurindo CAH, Torres RD, Mali SA, Gilbert JL, Soares P. Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: effect of high current density. *Mater Sci Eng C.* 2014;37(1):223–31.
21. Wennerberg A et al. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials.* 1996;17(1):15–22.
22. Lazzara RJ, Porter SS, Testori T, Galante J, Zetterqvist L. A prospective multicenter study evaluating loading of osseotite implants two months after placement: one-year results. *J Esthet Dent.* 1998;10(6):280–9.

23. Oliveira WF, Arruda IRS, Silva GMM, Machado G, Coelho LCBB, Correia MTS. Functionalization of titanium dioxide nanotubes with biomolecules for biomedical applications. *Mater Sci Eng C*. 2017;81(May):597–606.
24. Cremasco A, Messias AD, Esposito AR, Duek EADR, Caram R. Effects of alloying elements on the cytotoxic response of titanium alloys. *Mater Sci Eng C*. 2011;31(5):833–9.
25. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 11(5):391–401.
26. Oh S, Daraio C, Chen L-H, Pisanic TR, Fiñones RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *J Biomed Mater Res Part A*. 2006;78A(1):97–103.
27. Huo K, Gao B, Fu J, Zhao L, Chu PK. Fabrication, modification, and biomedical applications of anodized TiO₂ nanotube arrays. *RSC Adv*. 2014;4(33):17300–24.
28. Kasperczyk J, Jelonek K, Ryba M, Walski M, Bero M. Application of the lithium and magnesium initiators for the synthesis of glycolide. *J Biomed Res A*. 2006;79(4):865–73.
29. Ishizawa Hitoshi, Ogino Makoto. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(1):65–72.
30. Hench LL. Bioceramics: from Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc*. 1991;74(7):1487–510.
31. Kim JM, Kim HS. Processing and properties of a glass-ceramic from coal fly ash from a thermal power plant through an economic process. *J Eur Ceram Soc*. 2004;24(9):2825–33.
32. Wang Y, Lei T, Jiang B, Guo L. Growth, microstructure and mechanical properties of microarc oxidation coatings on titanium alloy in phosphate-containing solution. *Appl Surf Sci*. 2004;233(1–4):258–67.
33. Carlos Nelson Elias LES. Biocompatibilidade do titânio e a superfície vulcano. *Rev Bras Implantodont*. 2006;12(3):6–11.
34. Li B, Hao J, Min Y, Xin S, Guo L, He F, et al. Biological properties of nanostructured Ti incorporated with Ca, P and Ag by electrochemical method. *Mater Sci Eng C*. 2015;51:80–6.
35. Sul YT. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: Special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. *Biomaterials*. 2003;24(22):3893–907.
36. Ellingsen J. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials*. 1991;12(6):593–6.
37. Jones F. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf Sci Rep*. 2001;42(3–5):75–205.

38. Yan Guo C, Tin Hong Tang A, Pekka Matinlinna J. Insights into surface treatment methods of titanium dental implants. *J Adhes Sci Technol*. 2012;26(1–3):189–205.
39. Gnedenkov S V., Sinebryukhov SL, Puz' A V., Kostiv RE. In vivo osteogenerating properties of calcium phosphate coatings on Ti-6Al-4V titanium alloy. *Biomed Eng*. 2017;51(2):116–9.
40. Galli S, Andersson M, Jinno Y, Karlsson J, He W, Xue Y, et al. Magnesium release from mesoporous carriers on endosseous implants does not influence bone maturation at 6 weeks in rabbit bone. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2016;105(7):1–8.
41. Kim B-S, Kim JS, Park YM, Choi B-Y, Lee J. Mg ion implantation on SLA-treated titanium surface and its effects on the behavior of mesenchymal stem cell. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(3):1554–60.
42. Jiang X, Wang G, Li J, Zhang W, Xu L, Pan H, et al. Magnesium ion implantation on a micro/nanostructured titanium surface promotes its bioactivity and osteogenic differentiation function. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:23-87.
43. Kim SR, Lee JH, Kim YT, Riu DH, Jung SJ, Lee YJ, et al. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. *Biomaterials*. 2003;24(8):1389–98.
44. Galli S, Naito Y, Karlsson J, He W, Andersson M, Wennerberg A, et al. Osteoconductive potential of mesoporous titania implant surfaces loaded with magnesium: An experimental study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17(6):1048–59.
45. Cecchinato F, Karlsson J, Ferroni L, Gardin C, Galli S, Wennerberg A, et al. Osteogenic potential of human adipose-derived stromal cells on 3-dimensional mesoporous TiO₂ coating with magnesium impregnation. *Mater Sci Eng C*. 2015;52:225–34.
46. Park JW, An CH, Jeong SH, Suh JY. Osseointegration of commercial microstructured titanium implants incorporating magnesium: a histomorphometric study in rabbit cancellous bone. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(3):294–300.
47. Oliveira FG, Ribeiro AR, Perez G, Archanjo BS, Gouvea CP, Araújo JR, et al. Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO₂ anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium. *Appl Surf Sci*. 2015;341:1–12.
48. Sul Y-T, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomaterials*. 2005;26(33):6720–30.
49. Sul Y-T, Johansson C, Albrektsson T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. *Int J Prosthodont*. 19(4):319–28.

50. Ren N, Li J, Qiu J, Sang Y, Jiang H, Boughton RI, et al. Nanostructured titanate with different metal ions on the surface of metallic titanium: a facile approach for regulation of rBMSCs fate on titanium implants. *Small*. 2014;10(15):3169–80.
51. Wang T, Wan Y, Liu Z. Synergistic effects of bioactive ions and micro/nano-topography on the attachment, proliferation and differentiation of murine osteoblasts (MC3T3). *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(8):133.
52. Almaguer-Flores A, Ximénez-Fyvie LA, Rodil SE. Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2010;92(1):196–204.
53. Katsikogianni M, Missirlis YF, Harris L, Douglas J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cells Mater*. 2004;8:37–57.
54. Kreve S, Cândido dos Reis A. Influence of the electrostatic condition of the titanium surface on bacterial adhesion: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2021;125(3):416–20.
55. Wang T, Flint S, Palmer J. Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation. *Biofouling*. 2019;35(9):959–74.
56. Chen G, Walker SL. Role of solution chemistry and ion valence on the adhesion kinetics of groundwater and marine bacteria. *langmuir*. 2007;1(13):7162–9.
57. Lee J-H, Kim Y-G, Yong Ryu S, Lee J. Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2016;6(1):19267.
58. Robinson DA, Griffith RW, Shechtman D, Evans RB, Conzemius MG. In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomater*. 2010;6(5):1869–77.
59. Mihailescu N, Stan GE, Duta L, Chifiriuc MC, Bleotu C, Sopronyi M, et al. Structural, compositional, mechanical characterization and biological assessment of bovine-derived hydroxyapatite coatings reinforced with MgF₂ or MgO for implants functionalization. *Mater Sci Eng C*. 2016;59:863–74.
60. Jemt T, Stenport V, Friberg B. Implant treatment with fixed prostheses in the edentulous maxilla. Part 1: implants and biologic response in two patient cohorts restored between 1986 and 1987 and 15 years later. *Int J Prosthodont*. 2011;24(4):345–55.
61. do Nascimento C, de Albuquerque RF, Monesi N, Candido-Silva JA. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):3039–40.

APÊNDICE A – MATERIAL E MÉTODO DETALHADO

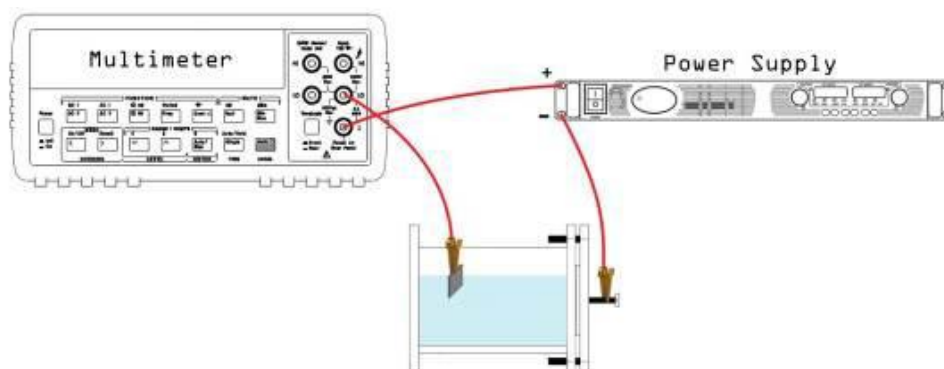
Obtenção Da Liga

Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados discos de Ti-35Nb-7Zr-5Ta. A preparação da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta foi realizada com a obtenção de lingotes de 30 a 70 gramas. A fusão foi realizada em forno a arco-voltáico, com atmosfera inerte, controlada por uma bomba de vácuo e fluxo de argônio. As ligas foram refundidas três vezes para alcançar homogeneidade composicional. Após a fundição, os lingotes foram submetidos a um tratamento térmico de homogeneização a 1000 oC durante 8 horas (a vácuo), para então serem forjados e usinados em forma de discos. Em seguida, as amostras foram submetidas a novo tratamento térmico para alívio de tensões, sendo mantidas a 1000 oC durante uma hora(8).

Todas as amostras foram submetidas a procedimentos de acabamento e polimento em politriz. Inicialmente, lixas de carboneto de silício (Norton Abrasivos do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) de granulações 120, 320, 600 (30 segundos cada) foram utilizadas, seguidas das granulações 1200 e 2000 (40 segundos cada) na presença de água, com 600 rpm e 0,5 kgf. Na sequência, os discos foram submetidos a ataque químico em solução de Kroll (H₂O/HF/HNO₃). Os corpos-de-prova obtidos foram divididos em grupos com base nos tratamentos de superfície realizados.

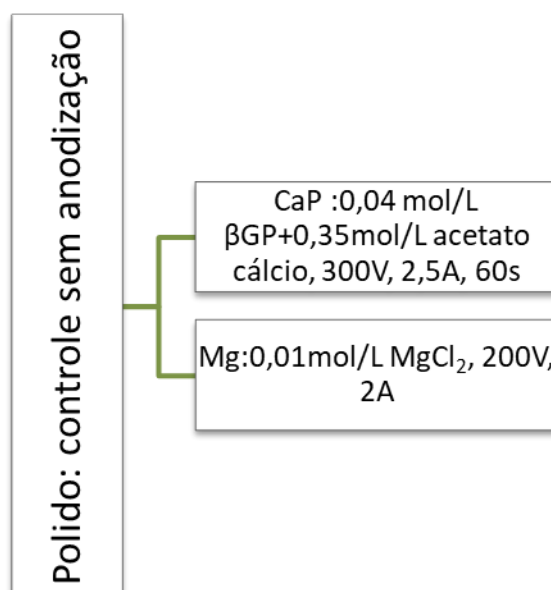
Anodização Das Superfícies

O tratamento das superfícies foi baseado na técnica de anodização eletroquímica (PEO). Para tanto, após o ataque em solução de Kroll, que remove o filme passivo original, os corpos-de-prova foram montados em uma célula eletroquímica conectada a um multímetro digital e a uma fonte de energia (N5771A, Agilent Technologies do Brasil São Paulo, SP, Brasil) (Figura A1).

Figura A1 - Representação do sistema de PEO

Fonte: Elaboração própria

Os corpos-de-prova obtidos foram divididos em grupos com base nos tratamentos de superfície realizado, como descritos abaixo (Figura A2).

Figura A2 - grupos experimentais

Fonte: Elaboração própria

Caracterizações Das Superfícies

A caracterização das superfícies foi realizada por meio de técnicas para avaliação da topografia superficial, composição química, mensuração da energia livre de superfície, da rugosidade média (Ra), e de teste de adesão dos filmes anodizados.

Topografia de superfície: amostras de todos os grupos e subgrupos experimentais foram analisadas Microscópio de Varredura de Alta Resolução (FEG-MEV; JEOL modelo

7500F), localizado na Faculdade de Química de Araraquara- Unesp e microscopia de força atômica para avaliação da topografia da superfície das amostras em escala nanométrica.

Análise Química: As amostras foram submetidas à análise química semi quantitativa utilizando-se a técnica espectroscopia por dispersão em energia de raios X (EDS) (FEG-MEV; JEOL modelo 7500F)

Difração de raio x: A difração de raios X (DRX) com $K\alpha$ de cobre foi usada para examinar a estrutura cristalina de todas amostras que foram tratadas e depois limpas por vibração ultra-sônica. As constantes de cada fase foram calculadas pelos picos de baixo ângulo com índices conhecidos de Miller, tipo de célula e padrão interno.

Molhabilidade: O ângulo de contato (CA) com a água bidestilada das amostras foi medido usando o goniômetro (Ramé-Hart 100-00, Succasunna, NJ, EUA) pelo método da gota sésil. Gotículas de água de aproximadamente de 8,0 μL foram dispensados cuidadosamente nas amostras por uma seringa, e os CAs foram obtidos medindo-se em diferentes posições em cada amostra e o valor médio é relatado.

Rugosidade média: A rugosidade média (R_a) de todas amostras foi mensurada antes e após os procedimentos de anodização, em um rugosímetro (Mitutoyo SJ 400 – Mitutoyo Corporation - Japão), com precisão de leitura de 0,01 μm , comprimento de leitura de 2,4mm, velocidade da ponta ativa de 0,5mm/s e raio da ponta ativa de 5 μm . Foram realizadas três medidas em cada superfície e a média entre as leituras foi determinada como o valor da R_a (μm) de cada amostra.

Adesão do filme: a adesão do filme à superfície da liga foi avaliada seguindo o teste de tensão dos revestimentos metálicos e de fosfato de cálcio, norma preconizada pela Sociedade Americana de Ensaio e Materiais (ASTM Internacional), na qual unimos uma amostra tratada a outra amostra não tratada com um adesivo polimérico e utilizamos a máquina universal de ensaios mecânicos (EMIC DL2000) para realizar o teste de tensão com uma célula de carga de 40kgf. (Figura A3)

Figura A3 - Sistema com carga de 40kgf montados na EMIC



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Módulo de elasticidade: A medida do módulo de elasticidade (GPa) foi realizada por meio da técnica de excitação por impulso, de acordo com a norma ASTM E2804, que consiste em um ensaio não destrutivo. Utilizou-se o equipamento ATCP Sonelastic, conectado a um computador com software para o processamento de sinal. O equipamento está alocado no laboratório de microestruturas e propriedades em processos de solidificação M2PS do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa)- UFSCar/São Carlos-SP

Obtenção das células

Toda metodologia referente cultura celular foi realizada no Laboratório Biologia Molecular, localizado na Faculdade de Odontologia Araraquara (FOAr), com supervisão do Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli.

Depois de obtidos e tratados os discos foram esterilizados em luz ultravioleta e na sequência acondicionados sob a base dos poços de placas de microtitulação com 24 poços. Para a extração das células foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus holtzman*, com 15 a 21 dias, com peso inicial de aproximadamente 50 gramas. Após anestesia com Ketamina (0,08 mL/ 100 g) e Xilazina (0,04 mL/ 100 g), os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico. Inicialmente foi feita a dissecação do fêmur e da tíbia bilateral, cortando-se as epífises e realizando a lavagem da parte medular dos ossos com meio de cultura celular α -MEM com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 100 U/mL de penicilina e 100

$\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (P/S). O conteúdo da medula óssea foi centrifugado a 300 g por 5 min em temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 10 mL de αMEM com 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina para cada osso longo, semeadas em placas de cultura de 100 mm e cultivadas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. Após 24 h foi feita a troca do meio de cultura para remoção das células não aderidas. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias, até uma expansão celular com uma confluência em torno de 80%. Neste estágio as células foram congeladas em FBS com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Avaliação de Morfologia e Proliferação/Citotoxicidade celular

MEV: Após 3 e 7 dias de cultivo celular, as amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2 % (Sigma- Aldrich®, EUA) em $\alpha\text{-MEM}$ puro (Gibco®) e glutaraldeído a 2% (Sigma®) em tampão cacodilato 0,1 mol.L⁻¹ (Sigma®), lavadas em solução tampão fosfato (PBS), desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, secas, mantidas em um dissecador a vácuo e recobertas com uma camada de 6 nm de ouro, para as análises.

Alamar Blue: Após 3, 7, 10, 14 e 21 dias de incubação utilizamos o Kit Alamar Blue® (Molecular Probes, EUA), para avaliarmos a ocorrência da reação de redução no interior das mitocôndrias celulares de células viáveis, que converte o produto resazurina (coloração azul) para sua forma reduzida resofurina (coloração rósea). Este composto reduzido é transportado para fora das células onde se consegue quantificá-lo espectrofotometricamente no sobrenadante. Os discos com as células foram incubados em uma placa de 24 poços, contendo 1 mL de meio ($\alpha\text{-MEM}$ suplementado com 10% de FBS, 1% de P/S, 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico, 10 mM de $\beta\text{-glicerofosfato}$ e 10% de Alamar Blue®. Após o tempo de incubação de 4 horas, alíquotas de 150 μL foram coletadas de cada amostra e transferidas para uma placa de 96 poços para a leitura em um espectrofotômetro em comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O número de células viáveis está relacionado com o nível de redução de corante, cuja viabilidade é expressa em percentual de redução de acordo com o protocolo do fabricante. Sendo assim, para a análise dos resultados foi calculado a diferença do percentual de redução comparando os grupos testes com o grupo controle positivo (C^+ = células cultivadas no plástico da placa de cultura).

Fosfatase Alcalina: As células foram imersas em solução de laurilsulfato de sódio (1mg/ml) por 30 minutos, e posteriormente utilizado o Kit comercial Fosfatase Alcalina (Labtest, Lagoa Santa, MG), segundo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi

realizada em espectrofotômetro (Asys-UVM 340, Biochrom – MikroWin 2000) em comprimento de onda de 590 nm.

Teste de MTT: As células foram lavadas com solução salina – PBS 1x, e mantidas em contato com sal de MTT por 3 horas. Em seguida lavadas com álcool isopropílico acidificado para solubilizar o formazan. A densidade óptica foi aferida em espectrofotômetro com filtro de 570 nm (Asys-UVM 340, Biochrom – MikroWin 2000). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos três vezes em 24, 48 e 72 hs.

Avaliação microbiana

Toda metodologia referente a bactérias foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular, localizado na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP), com supervisão do Prof. Dr. Cassio do Nascimento

Seleção dos participantes

Os pacientes foram selecionados com base nos seguintes critérios de inclusão: indivíduos saudáveis com uma dentição completa e sem sinais clínicos de doenças. Serão excluídos pacientes com base nos seguintes critérios de exclusão: gravidez, lactação, cárie dentária, tratamento de doença periodontal ou uso de antibióticos nos últimos 3 meses, tabagista ou qualquer doença sistêmica que possa influenciar o estado periodontal.

Obtenção da saliva

Saliva não estimulada foi coletada de participantes saudáveis como meio contaminante para a incubação dos espécimes. Cinco mililitros de saliva foram coletados de 10 indivíduos saudáveis e inseridos em um micro tubo. Os participantes foram selecionados na Clínica da Faculdade de Odontologia Araraquara - UNESP, receberam orientações quanto aos procedimentos da pesquisa e tinham o direito de decidir por participar ou não da fase experimental do estudo. Os participantes potenciais foram convidados a participar do estudo se: (A) não exibissem manifestações orais de doenças sistêmicas ou processos infecciosos agudos na cavidade oral; (B) não tivessem sob tratamento com antibióticos nos últimos 3 meses

As amostras foram esterilizadas em luz ultravioleta antes da incubação. Cinco espécimes de cada grupo foram distribuídos em placas de 24 poços. A saliva foi depositada em cada poço e as placas incubadas a 37 ° C para biofilme precoce por 7 dias (biofilme maduro). Primeiramente, a superfície dos espécimes foi lavada cuidadosamente com solução tampão TE (10 Mm Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) estéril para a remoção de detritos e células bacterianas não aderidas. Em seguida, o biofilme foi coletado individualmente de cada disco com auxílio de escova do tipo microbrush esfregada sobre a superfície do disco por 20

segundos. A ponta de cada microbrush foi depositada em microtubos identificados, aos quais foram adicionados 250 μ L de solução tampão TE para preservar a estabilidade do material genético das amostras de biofilme. As amostras foram armazenadas a 4°C até o momento da realização dos ensaios microbianos para evitar ciclos de congelamento-descongelamento que poderiam afetar a integridade do DNA.

Hibridização por DNA-DNA Checkerboard

Para a realização da técnica de hibridização por DNA-DNA Checkerboard (n=9), 150 μ L das amostras de biofilme armazenadas foram transferidos para novos microtubos, aos quais foram adicionados 150 μ L de solução NaOH 0.5 M com o objetivo de permitir a lise celular e suspensão do DNA na solução. As amostras de DNA em suspensão foram armazenadas a 4°C até o momento da realização da técnica de hibridização por DNA-DNA Checkerboard.

Obtenção das espécies-alvo de detecção: trinta e cinco espécies microbianas, incluindo colonizadores primários, patógenos associados à doença periodontal e peri-implantar e fungos foram selecionados para este estudo. O DNA genômico de todas as espécies-alvo foram adquiridos da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC®, EUA).

Confecção das sondas de DNA genômico: A confecção das sondas genômicas das 35 espécies-alvo de detecção deste estudo foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante do marcador genômico (*Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detect System*, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O protocolo consiste na marcação de 100 ng do DNA genômico da espécie-alvo com a enzima fosfatase alcalina em uma concentração final de 1 ng/ μ L de sonda na solução de hibridização. Os DNAs em concentração de 10 ng/ μ L foram diluídos em microtubos contendo um volume final de 10 μ L. Após a diluição, os DNAs foram desnaturados em água fervente por 5 minutos e imediatamente resfriados em gelo durante 5 minutos para manter as cadeias de nucleotídeos abertas. Com os microtubos mantidos em gelo, foram adicionados os componentes do kit de marcação: 10 μ L de *Reaction buffer*, 2 μ L de *Labelling reagent* e 10 μ L de *Cross-linker solution* (1:4) (GE Healthcare). O conteúdo dos microtubos foi homogeneizado por pipetagem e as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos em banho-maria. Em seguida, adicionou-se glicerol (50% v/v) em cada microtubo contendo a sonda de DNA marcada e foi realizado o armazenamento a -20°C até o processamento laboratorial das amostras de biofilme.

Desnaturação e neutralização das amostras de biofilme: Os microtubos contendo as amostras de biofilme foram expostos à temperatura ambiente e homogeneizados por 4 minutos em agitador de tubos (AP 56, Phoenix Luferco, Araraquara, Brasil) para

desagregação total do conteúdo coletado nas escovas do tipo microbrush. Em seguida, os microtubos foram fervidos a 95°C por 5 minutos para a desnaturação das fitas de DNA e imediatamente resfriados em gelo por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram neutralizadas pela adição de 800 µL de acetato de amônio 5M. Amostras padrão contendo 10^5 e 10^6 células de cada uma das 40 espécies-alvo também foram processadas seguindo o mesmo protocolo descrito para servirem como padrões de comparação para a quantificação dos sinais de hibridização.

Preparo da membrana: Uma membrana de nylon carregada positivamente de 15 cm² (Hybond N+, GE Healthcare) foi posicionada dentro de um aparelho metálico constituído de 30 canaletas dispostas paralelamente, denominado *Minislot* 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA). Esse aparelho possibilita a aplicação de 28 diferentes amostras e 2 padrões (10^5 e 10^6 células) em canaletas individuais sobre a membrana. Para este estudo, foi utilizado um aparelho *Minislot* 30 e uma membrana para permitir a avaliação de todas as amostras do estudo. Cada amostra teste e os padrões de comparação foram depositados no interior das canaletas com auxílio de pipetas automáticas de precisão (Figura A4). Após a deposição, o aparelho foi mantido em repouso por 5 minutos para que houvesse a ligação do DNA das amostras à membrana de nylon e a solução remanescente foi removida por meio de bomba à vácuo conectada ao *Minislot* 30. Em seguida, a membrana foi removida do aparelho, transferida para invólucro de papel kraft e mantida em estufa a 120°C (SX 1.2 DTME, Sterilifer Ind. e Com. Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 20 minutos para a fixação do DNA sobre a membrana (Figura A4).

Figura A4 - Aplicação das amostras individualmente às canaletas do aparelho, transferência da membrana para invólucro de papel kraft e incubação da membrana em estufa (120°C por 20 minutos)



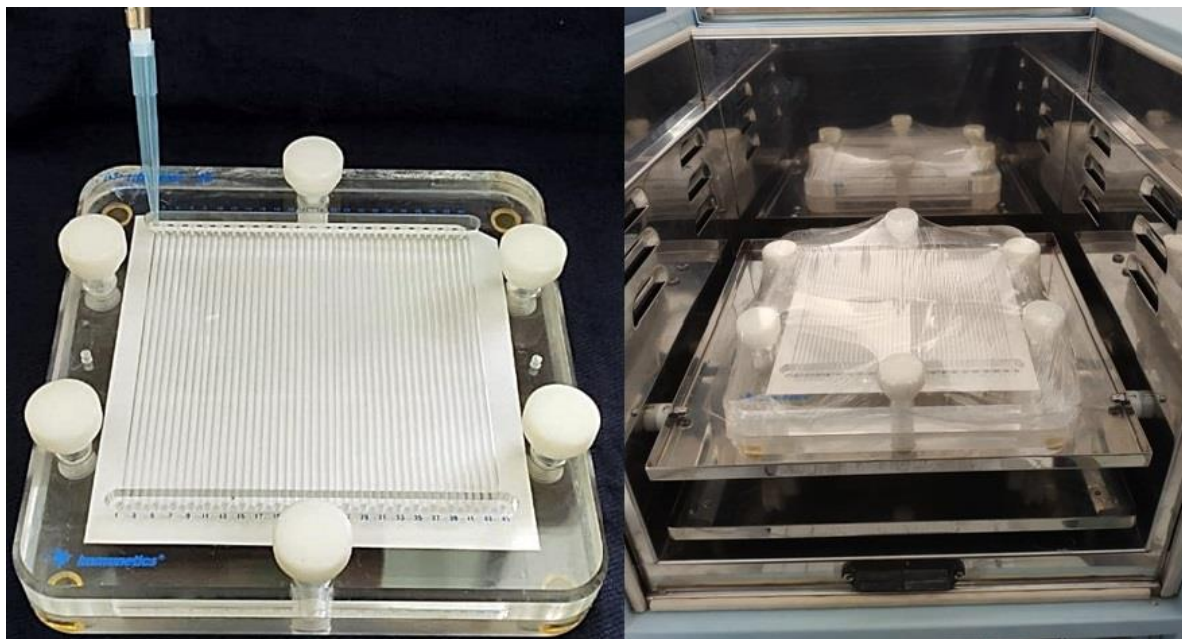
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Pré-hibridização das amostras fixadas sobre a membrana de Nylon: Após a fixação do DNA das amostras e dos padrões de comparação, uma solução contendo 1.8 g NaCl 1 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e 1.2 g de *Blocking reagent* (GE Healthcare) diluídos em 30 mL de *Hybridization buffer* (GE Healthcare) foi preparada e aplicada sobre a membrana. A membrana foi embaladas em invólucro de plástico e pré-hibridizada em forno de hibridização por 63,5°C durante 6 horas sob agitação suave.

Aplicação das sondas de DNA genômico marcadas e reação de hibridização: Após a etapa de pré-hibridização, a membrana foi depositada em um dispositivo acrílico denominado *Miniblotter 45* (Immunetics). Este dispositivo apresenta 45 canaletas individuais de hibridização, o que permite a aplicação simultânea de sondas de DNA genômico marcadas de até 45 espécies-alvo distintas sobre a membrana. A membrana foi posicionada de forma que as amostras de DNA investigadas e os padrões previamente fixadas ficassem orientadas em um ângulo de 90° com as canaletas do *Miniblotter 45*, formando “tabuleiro de xadrez” entre as amostras e as sondas genômicas marcadas (Figura A5). Dessa forma, reações de hibridização independentes ocorrem nas intersecções entre as amostras e as sondas depositadas na membrana por meio do pareamento das cadeias de DNA. O primeiro passo do protocolo de hibridização é a deposição de 160 µL de sonda genômica de cada uma das 35 espécies-alvo de forma individual nas canaletas do *Miniblotter 45*. Em seguida, o dispositivo é envolvido em filme de PVC e embalado em saco plástico para evitar ressecamento da membrana. O

conjunto foi mantido em forno de hibridização em temperatura de 63,5°C sob agitação suave por 16 horas (Figura A5).

Figura A5 - Membrana inserida no interior do aparelho Miniblotter com aplicação das sondas marcadas das espécies-alvo de detecção e incubação do aparelho embalado em filme de PVC em forno de hibridização (63,5°C por 16 horas);



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Lavagem das membranas para remoção das sondas não hibridizadas: Após a reação de hibridização, as membranas foram submetidas a processos de lavagem sob agitação vigorosa em forno de hibridização para remoção de sondas que não hibridizaram completamente (ligações inespecíficas entre os DNAs). Duas lavagens de 30 minutos cada a 67,5°C foram realizadas depositando as membranas em solução contendo: ureia 2 M (Sigma Chemical Co.), dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (Sigma Chemical Co.), NaH_2PO_4 50 mM (pH=7; Sigma Chemical Co.), NaCl 150 mM (Sigma Chemical Co.), MgCl_2 1mM (Sigma Chemical Co.) e *Blocking reagent* (GE Healthcare). Em seguida, duas lavagens de 15 minutos cada em temperatura ambiente foram realizadas depositando as membranas em solução contendo: Tris 1 M (Sigma Chemical Co.), NaCl 2 M (Sigma Chemical Co.) e MgCl_2 1 M (Sigma Chemical Co.).

Deteção dos sinais de hibridização: Os sinais de hibridização gerados pela reação entre os DNAs das amostras investigadas e amostras padrões com os DNAs das sondas genômicas marcadas com fosfatase alcalina de cada uma das 35 espécies-alvo foram detectados por uma reação de quimiluminescência. Após as lavagens, 3 mL do reagente de

detecção CDP-Star® (GE Healthcare) foram aplicados sobre cada membrana e deixados para reagir com a sua superfície durante 30 minutos ao abrigo de luz (Figura A6). O reagente de detecção utilizado consiste em um substrato quimiluminescente para a enzima fosfatase alcalina, o qual reage com as sondas marcadas e possibilita a detecção dos sinais de hibridização por uma reação de quimiluminescência.

Exposição da membrana e revelação dos sinais: Cada membrana foi posicionada dentro de um cassete de autorradiografia (Hypercassete, Buckinghamshire, Reino Unido) e armazenada em câmara escura em contato com um filme para autorradiografia (HyperFilm, GE Healthcare) durante 3 horas (Figura A6). Após esse período, os filmes expostos foram revelados por 1,5 minutos e fixados por 3 minutos em soluções de processamento radiográfico convencional (Kodak, Rochester, NY, EUA). Ao final do processo são obtidos filmes autorradiográficos em que é possível observar os sinais quimiluminescentes (sinais de hibridização) formados nas regiões de intersecção entre as amostras e as sondas devido ao pareamento entre as cadeias de DNA das amostras e das sondas genômicas marcadas.

Figura A6 - Lavagem da membrana e revelação dos sinais de hibridização gerados em filme autorradiográfico.

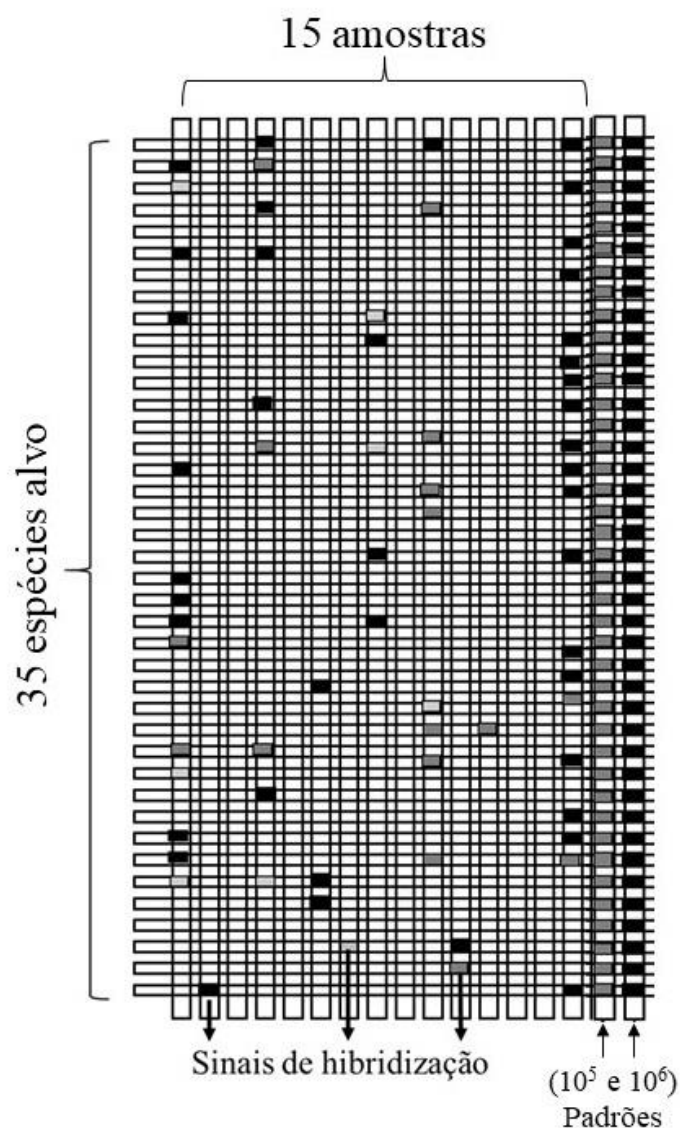


Fonte: Arquivo pessoal do autor

Interpretação dos sinais de hibridização: A Figura A7 ilustra um esquema da reação de hibridização de uma membrana, formando um padrão “tabuleiro de xadrez” (*Checkerboard DNA-DNA*). As linhas horizontais representam as 35 sondas marcadas, as linhas verticais representam as 15 amostras e dois padrões de quantificação (10^5 e 10^6) aplicados sobre a membrana e nas intersecções estão representadas as reações de hibridização DNA-DNA. Os sinais de hibridização formados permitem realizar a análise semi-quantitativa da presença das espécies-alvo investigadas em cada amostra analisada, uma vez que a intensidade do sinal é

diretamente proporcional à quantidade de células de determinada espécie na amostra. Portanto, após a revelação dos filmes autorradiográficos com os sinais de hibridização, estes foram fotografados e as imagens obtidas foram analisadas no software CLIQS 1D® (Totallab, Newcastle, Inglaterra) para a determinação do número aproximado de células microbianas presentes em cada amostra de biofilme avaliada. O cálculo é feito pela comparação da intensidade dos sinais de hibridização gerados pela reação entre as sondas marcadas e as amostras investigadas com os gerados entre as sondas e os padrões contendo 10^5 e 10^6 células de cada uma das 35 espécies-alvo.

Figura A7 - Representação da membrana obtida após revelação dos sinais de hibridização. Observa-se a formação de sinais de hibridização em diferentes intensidades na intersecção formada entre as amostras investigadas e os padrões com as sondas das 35 espécies-alvo de detecção. A intensidade do sinal gerado é diretamente proporcional à quantidade de células da espécie-alvo presentes



Fonte: Elaboração própria

Não autorizo a publicação deste trabalho até o prazo de 2 anos após a data de defesa.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 15 de dezembro de 2021.

Bárbara Araújo dos Reis