

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA

CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

DANIELLE DUQUE DOMINGUES

**Avaliação da Superfície da Liga Ti15Zr15Mo após Funcionalização –
Estudos *In Vitro***

Ilha Solteira - SP

2024

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

Danielle Duque Domingues

Avaliação da Superfície da Liga Ti15Zr15Mo após Funcionalização – Estudos *In Vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Unesp como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência dos Materiais.

Área de Conhecimento: Ciência dos Materiais - Área Biomateriais.

Orientadora

Dra. Ana Paula Rosifini Alves

Coorientador

Dr. Diego Rafael Nespeque Correa

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

D671a Domingues, Danielle Duque.
Avaliação da superfície da liga Ti15Zr15Mo após funcionalização – estudos in vitro / Danielle Duque Domingues. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024
154 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Ciência e Engenharia de Materiais, 2024

Orientador: Ana Paula Rosifini Alves

Co-orientador: Diego Rafael Nespeque Correa

Inclui bibliografia

1. Biomateriais. 2. Ligas de titânio. 3. Liga Ti15Zr15Mo. 4. Oxidação por micro arco. 5. Oxidação por plasma eletrolítico. 6. Funcionalização da superfície.


Amanda Sertori dos Santos
Bibliotecária - CRB/5-9061
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao
Usuário e Documentação
Direção Técnica de Biblioteca e Documentação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA Ti15Zr15Mo APÓS FUNCIONALIZAÇÃO - ESTUDOS IN VITRO

AUTORA: DANIELLE DUQUE DOMINGUES

ORIENTADORA: ANA PAULA ROSIFINI ALVES

COORIENTADOR: DIEGO RAFAEL NESPEQUE CORRÊA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciência dos Materiais, área: Ciência e Engenharia dos Materiais pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 ANA PAULA ROSIFINI ALVES
Data: 20/11/2024 11:06:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ANA PAULA ROSIFINI ALVES (Participação Presencial)
Departamento de Materiais e Tecnologia / Faculdade de Engenharia e Ciências - UNESP

Prof. Dr. CARLOS ROBERTO GRANDINI (Participação Virtual)
Departamento de Física e Meteorologia / Faculdade de Ciências - UNESP

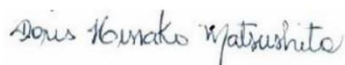
Profa. Dra. PATRICIA CAPELLATO (Participação Virtual)
Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI

Profa. Dra. DORIS HISSAKO MATSUSHITA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Aracatuba - UNESP

Profª. Drª. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA (Participação Virtual)

Ilha Solteira, 23 de setembro de 2024

Documento assinado digitalmente
 CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA
Data: 19/11/2024 20:28:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Eu, Doris Hissako Matsushita, aprovo dia 19/11/2024



Eu, Patricia Capellato, aprovo dia 18/11/2024



Eu, Carlos Roberto Grandini, aprovo em
18/11/2024

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa desenvolvida, integrante do Projeto CAPES-PrInt, enquadra-se nos ODSs 3 (saúde e bem estar) e 9 (indústria, inovação e infraestrutura). A partir do estudo de tratamentos de superfície em uma nova liga do tipo beta com excelentes propriedades de volume, espera-se a proposição de novos caminhos na fabricação de implantes para aplicações biomédicas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The research developed, part of CAPES-PrInt Project, fits into SDGs 3 (health and well-being) and 9 (industry, innovation and infrastructure). From the study of surface treatments in a new beta-type alloy with excellent volume properties, it is expected to propose new paths in the manufacture of implants for biomedical applications.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Ilha Solteira

Dedico este trabalho aos meus pais por todo o apoio e incentivo em todos os momentos.
Vocês são as minhas raízes e as minhas asas. Sou grata por me darem tanta força.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora *Profa. Dra. Ana Paula Rosifini Alves* por todo o incentivo, ensinamentos e por não medir esforços em me ajudar;

ao meu coorientador *Prof. Dr. Diego Rafael Nespeque Correa* pela motivação e dedicação, além da ajuda na solubilização das amostras e no PEO;

à Unesp, pela oportunidade de realizar este estudo que me gerou grandes conhecimentos, incluindo o corpo docente, que não mediu esforços para passar seus ensinamentos com tanta excelência. A todos, minha gratidão!

aos amigos do Grupo de Biomateriais da Unesp/FEG pelo apoio e ajuda, em especial à *Jasmine Keise, Rita Rangel* e à *Thaís Rodrigues* pela ajuda ao longo do doutorado e parceria em todos os momentos;

à *Bianca Moya, Letícia Pagoto, Marcelo Bortoletto* e *Rodrigo Garozi*, amigos que o doutorado me deu, durante o qual passamos momentos de tensão e, principalmente, de muitas alegrias. Agradeço por me acompanharem nesta jornada;

ao *Prof. Dr. Carlos Roberto Grandini* pelos metais que, posteriormente, foram utilizados no processamento e obtenção da liga;

ao *Prof. Dr. Caram* e *João Pólis* da Unicamp pelo forjamento a quente do lingote;

ao meu amigo *Celso Bortolini Júnior* pelo companheirismo e suporte durante o doutorado, além da colaboração no processamento da liga;

ao Departamento de Engenharia de Materiais da USP/EEL pela realização da solubilização;

ao grupo do *Prof. Dr. Nilson Cruz* da Unesp/ICTS-Campus Sorocaba pela colaboração na funcionalização da superfície das amostras, utilização do Laboratório de Plasmas Tecnológicos, do equipamento de PEO e realização do DRX;

ao Departamento de Materiais e Tecnologia da Unesp/FEG, especialmente aos técnicos, pela dedicação e colaboração na realização das etapas deste trabalho;

ao *Prof. Dr. Rogério Hein* pela realização da metalização das amostras, do MEV e dos EDS, além do auxílio na discussão dos resultados;

ao *Prof. Dr. Evaldo Corat* do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/INPE pela colaboração nas caracterizações e auxílio na discussão dos resultados;

à *Profa. Dra. Patricia Capellato* por toda a ajuda durante o desenvolvimento do trabalho;

ao grupo da *Profa. Dra. Daniela Sachs* da UNIFEI pela colaboração na avaliação biológica das amostras;

ao *Prof. Dr. Ketul Popat* e seu grupo pela colaboração na avaliação biológica das amostras, pelos ensinamentos e por terem me recebido em seu laboratório durante meu intercâmbio para os EUA;



aos meus amigos que fiz durante o intercâmbio para os EUA, que melhoraram a minha experiência no exterior;

ao *Prof. Dr. Emilio Satoshi Hara* e seu grupo pela colaboração na avaliação biológica das amostras;

à CAPES pela bolsa de estudos nacional e internacional;

à cada um dos membros da banca, pela disponibilidade de participação e contribuição para a minha tese;

à todas as pessoas que, de algum modo, fizeram ou fazem parte da minha vida. Agradeço a todos, de coração!



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Ilha Solteira

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Ilha Solteira

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

O titânio e as suas ligas são amplamente utilizados em aplicações biomédicas, principalmente em implantes ortopédicos e dentários, devido às suas propriedades adequadas para esta aplicação, tais como baixo módulo de elasticidade, alta resistência mecânica e à corrosão e excelente biocompatibilidade. Sua principal desvantagem é que eles não promovem a osseointegração completa devido à sua baixa bioatividade, portanto, é necessário realizar tratamento de superfície ou aplicar um revestimento de superfície para aumentar a formação inicial do tecido ósseo circundante. A oxidação por plasma eletrolítico (PEO) é um dos diversos métodos de modificação da superfície que podem proporcionar uma camada porosa e adesiva, com bioatividade para implantação, resultando em melhor osseointegração. Além disso, revestimentos de superfície com propriedades antimicrobianas têm sido estudadas para reduzir falhas de implantes e evitar infecções. Este estudo foi dividido em dois experimentos, no qual foi utilizada PEO com Ca, P e Sr (Experimento 1), seguindo de tratamento térmico (Experimento 2), com o objetivo de analisar e escolher qual grupo tem as propriedades mais promissoras para a área biomédica. Os resultados foram caracterizados com MEV, EDS, DRX, espectroscopia Raman, molhabilidade e, então ensaios biológicos foram realizados, tais como ensaios de atividade microbiológica e experimentos de viabilidade celular. Os resultados do Experimento 1 indicaram que a PEO foi bem sucedida ao criar uma camada na superfície das amostras com Ca, P e Sr. A partir das micrografias, tem-se que o grupo TZM PEO 0,07 M Sr gerou a camada mais homogênea e com poros bem distribuídos por toda a superfície. Com o EDS, conclui-se que todos os grupos têm uma proporção Ca/P menor do que 1,67. Em relação a todos os difratogramas, pode-se observar fase beta e de hidroxiapatita. A partir da molhabilidade, tem-se que todos os grupos após tratamento PEO são hidrofílicos. Quanto aos ensaios biológicos, há menos atividade microbiológica nos grupos com Sr e não tem diferença significativa entre eles. Entretanto, nos ensaios *in vitro* houve adesão celular em todas as amostras após 24h de cultura celular, mas morte celular no dia 7. Além disso, houve proliferação celular apenas no grupo controle (TZM), maior adesão de plaquetas e hemocompatibilidade no grupo TZM PEO 0,07 M Sr, indicando que esta condição tem potencial para aplicações biomédicas. Resultados obtidos no Experimento 2 sugerem que o grupo TZM PEO é mais interessante para melhorar as propriedades da liga Ti15Zr15Mo. As imagens do MEV mostram a camada com microporos aparentes e mais homogênea por toda a superfície é do grupo TZM PEO sem adição de Sr e sem calcinação. A partir do EDS, tem-se que todos os grupos possuem relação Ca/P menores que 1,67. Os difratogramas indicam fase beta e hidroxiapatita em todos os grupos, com fase rutilo no grupo TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado. Por sua vez, a espectroscopia Raman sugere presença de anatase, rutilo e fosfato. Resultados da microscopia confocal nos fornecem informações de rugosidade, no qual da maior para a menor foram: TZM PEO, TZM, TZM PEO Calcinado, TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado, que está de acordo com as informações obtidas até então. Isso pode ser complementado com o teste de atividade microbiológica, em que todos os grupos são estatisticamente similares, mas o que apresentou menor formação de colônia de bactérias foi o TZM PEO. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a topografia influencia na proliferação celular e que a superfície com micros poros aumenta a viabilidade e adesão celular na superfície das amostras. Porém, ao contrário da literatura, este estudo apresentou resultados de que a modificação da superfície com estrôncio não melhorou a bioatividade *in vitro* das amostras.

Palavras-chave: Biomateriais, Ligas de Titânio, Liga Ti15Zr15Mo, Oxidação por Micro Arco, Oxidação por Plasma Eletrolítico, Funcionalização da Superfície.

ABSTRACT

Titanium and its alloys are widely used in biomedical applications, mainly orthopedic and dental implants, due to their suitable properties for this application, such as low modulus of elasticity, high mechanical and corrosion resistance, and excellent biocompatibility. Their major drawback is that they do not promote complete osseointegration due to their low bioactivity; thus, it is necessary to perform a surface treatment or apply a surface coating to increase the initial formation of surrounding bone tissue. Plasma electrolytic oxidation (PEO) is one of several surface modification methods that can provide a porous and adhesive layer, with bioactivity for implantation, resulting in better osseointegration. Additionally, surface coatings with antimicrobial properties hold promise for reducing implant failures and preventing infections. This study was divided in two experiments, PEO was performed doped with Ca, P and Sr (Experiment 1), and followed by heat treatment (Experiment 2), in order to analyze and choose which group has the most promising properties to the biomedical area. Results were characterized by SEM, energy dispersive X ray, XRD, Raman spectroscopy, wettability and, then, biological assays were carried out, such as microbiological activity tests and cell viability experiments. Results of Experiment 1 indicated that PEO was successful in creating a layer on the surface of the samples with Ca, P and Sr. From the micrographs, it can be observed that the TZM PEO 0.07 M Sr group generated the most homogeneous layer with pores well distributed throughout the surface. With EDS, it can be concluded that all groups have a Ca/P ratio lower than 1.67. Regarding the diffractograms, the beta and hydroxyapatite phases can be observed. From the wettability, it can be observed that all groups after treatment with PEO are hydrophilic. Regarding the biological tests, there is lower microbiological activity in the groups with Sr and there is no significant difference between them. However, in the in vitro assays, there was cell adhesion in all samples after 24 h of cell culture, but cell death on day 7. In addition, there was cell proliferation only in the control group (TZM), greater platelet adhesion and hemocompatibility in the TZM PEO 0.07 M Sr group, indicating that this condition has potential for biomedical applications. The results obtained in Experiment 2 suggest that the TZM PEO group is more interesting to improve the properties of the Ti15Zr15Mo alloy. The SEM images show that the layer with apparent micropores and more homogeneous across the entire surface is from the TZM PEO group without Sr addition and without calcination. By EDS, it can be observed that all groups have a Ca/P ratio lower than 1.67. The diffractograms indicate beta phase and hydroxyapatite in all groups, with rutile phase in the TZM PEO 0.07 M Sr Calcined group. In turn, Raman spectroscopy suggests the presence of anatase, rutile and phosphate. The results of confocal microscopy provide information on roughness, in which from highest to lowest were: TZM PEO, TZM, TZM PEO Calcined, TZM PEO 0.07 M Sr Calcined, which is in agreement with the information obtained so far. This can be complemented with the microbiological activity test, in which all groups are statistically similar, but the one that presented the lowest formation of bacterial colonies was TZM PEO. From the results obtained, it can be concluded that topography influences cell proliferation and that the surface with micropores improves cell viability and adhesion on the surface of the samples. However, contrary to the literature, this study presented results that surface modification with strontium did not improve the in vitro bioactivity of the samples.

Keywords: Biomaterials, Titanium Alloys, Ti15Zr15Mo Alloy, Microarc Oxidation, Surface Functionalization.



LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	57
Equação 2.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Integração entre diversas disciplinas que podem contribuir para a pesquisa em biomateriais.	22
Figura 2 - A história dos biomateriais: da substituição à regeneração.	24
Figura 3 - Possíveis causas de falhas em implantes, que levam à cirurgia de revisão.	28
Figura 4 - Principais fatores que afetam a biocompatibilidade funcional de um implante biomédico.	30
Figura 5 - Ligas de titânio utilizadas em aparelhos médicos por todo o corpo humano.	37
Figura 6 - Métodos de modificação de superfície e suas vantagens, desvantagens e aplicações.	41
Figura 7 - A biocompatibilidade do revestimento produzido pela oxidação por plasma eletrolítico e seus benefícios.	44
Figura 8 - Exemplo da morfologia de uma camada de óxido formada pela oxidação por plasma eletrolítico.	45
Figura 9 - Representação gráfica dos fatores efetivos na oxidação por plasma eletrolítico.	50
Figura 10 - Esquema da relação entre o gráfico de potencial-tempo e o processo de formação do revestimento resultante da PEO.	51
Figura 11 - Representação esquemática da descarga do plasma dentro dos passos distintos do procedimento PEO.	53
Figura 12 - Ilustração esquemática indicando a adição de partículas ao filme de óxido do revestimento produzido pela oxidação por plasma eletrolítico.	54
Figura 13 - Esquema da conexão entre a hidroxiapatita e uma superfície de titânio.	58
Figura 14 - Ilustração das propriedades físico-químicas de superfície principais em relação à resposta biológica de um biomaterial.	62
Figura 15 - Diagrama ilustrando a interação entre as células e o material em superfícies lisas ou rugosas: (a) Estrutura da superfície influenciam na adsorção de proteínas; (b) As proteínas impactam na atração e anexação celular; (c) Proliferação, diferenciação e maturação.	63
Figura 16 - Contato direto com elementos antimicrobianos causa danos físicos e morte celular nas bactérias.	66
Figura 17 - Comparação entre a estrutura celular da bactéria (a) gram-negativa e (b) gram-positiva.	67
Figura 18 - Fluxograma da metodologia empregada nesta pesquisa, dividida em 4 etapas: Processamento e obtenção da liga; Tratamento de superfície; Caracterização da superfície e Caracterização biológica.	69
Figura 19 - Metais empregados na obtenção da liga Ti15Zr15Mo: (a) titânio; (b) zircônio e (c) molibdênio.	70
Figura 20 - Forno a arco voltaico utilizado no processamento da liga Ti15Zr15Mo.	71
Figura 21 - (a) Forno tubular utilizado no tratamento térmico de homogeneização; (b) e (c) Lingote obtido após a fusão dos metais e a homogeneização.	72
Figura 22 - Equipamento utilizado durante o forjamento a quente.	73
Figura 23 - (a) Lixamento com lixas abrasivas sob água corrente e (b) Banho ultrassônico.	74
Figura 24 - (a) Equipamento MAO-30, utilizado para o tratamento de superfície da liga Ti15Zr15Mo, (b) e (c) Esquema para a realização da PEO.	75
Figura 25 - (a) Microscópio eletrônico de varredura e (b) Espectrômetro detector de energia dispersiva, utilizados para a caracterização da morfologia e da análise elementar das amostras da liga de Ti15Zr15Mo após o tratamento da superfície por oxidação por plasma eletrolítico.	77

Figura 26 - Difratômetro utilizado para realizar a caracterização da liga Ti15Zr15Mo após a modificação da superfície por difração de raios X.	78
Figura 27 - Goniômetro utilizado para a caracterização da molhabilidade das amostras da liga Ti15Zr15Mo após o tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico.	79
Figura 28 - Esquema da sequência de preparação da solução McFarland.	80
Figura 29 - Esquema representando o ensaio antibacteriano.	81
Figura 30 - Metalizador de alto vácuo.	82
Figura 31 - Fluxograma da metodologia empregada nesta pesquisa, dividida em 4 etapas: Processamento e obtenção da liga; Tratamento de superfície; Caracterização da superfície e Caracterização biológica.	86
Figura 32 - Esquema ilustrativo do Experimento 2.	87
Figura 33 - Difratômetro utilizado para realizar a caracterização da liga Ti15Zr15Mo após a modificação da superfície por difração de raios X.	89
Figura 34 - Equipamento utilizado para a espectroscopia Raman.	90
Figura 35 - Microscópio confocal.	91
Figura 36 - Esquema ilustrativo do fluxo de trabalho de cultivo das células hBMSCs.	92
Figura 37 - Ensaio de adesão das amostras na liga de titânio Ti15Zr15Mo.	93
Figura 38 - Micrografias da superfície da liga Ti15Zr15Mo antes e após oxidação por plasma eletrolítico em eletrólito formado por 0,2 mol/L de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0,1 mol/L de NaH_2PO_4 e variou-se a concentração de $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO 0,01 M Sr (G3), (d) TZM PEO 0,04 M Sr (G4), (e) TZM PEO 0,07 M Sr (G5) e (f) TZM PEO 0,1 M Sr (G6), com ampliação de 10kx.	97
Figura 39 - Difratogramas da superfície das amostras da liga TZM, conforme os grupos que constam na legenda.	100
Figura 40 - Resultados obtidos na análise do ângulo de contato, por meio do método de gota séssil, considerando os meios ar, água e superfície da liga Ti15Zr15Mo: (a) G1 – TZM; (b) G2 – TZM PEO; (c) G3 – TZM PEO 0,01 M Sr; (d) G4 – TZM PEO 0,04 M Sr; (e) G5 – TZM PEO 0,07 M Sr; (f) G6 – TZM PEO 0,1 M Sr.	102
Figura 41 - Esquema de possíveis interações (a) hidrofílicas e (b) hidrofóbicas, em macro, micro e nanoescala.	104
Figura 42 - Análise da atividade microbiológica por meio de caracterização por MEV, com ampliação de 10 kx. Os grupos de estudo são: (a) TZM (G1); (b) TZM PEO (G2); (c) TZM PEO 0,01 M Sr (G3); (d) TZM PEO 0,04 M Sr (G4); (e) TZM PEO 0,07 M Sr (G5) e (f) TZM PEO 0,1 M Sr (G6).	105
Figura 43 - Análise estatística da atividade microbiológica das amostras da liga Ti15Zr15Mo, conforme os grupos na legenda apresentada.	106
Figura 44 - Imagens de microscopia de fluorescência das células adiposas coradas com DAPI e Faloidina/Rodamina. Dia 1: (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO 0,07 M Sr (G3). Dia 7: (d) TZM (G1), (e) TZM PEO (G2), (f) TZM PEO 0,07 M Sr (G3).	107
Figura 45 - Micrografias MEV mostrando a morfologia das células após 24h de cultura celular: (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO 0,07 M Sr (G3), com ampliação de 15 kx.	108
Figura 46 - Resultados da proliferação celular determinada por AlamarBlue® após 5 e 7 dias de incubação.	109
Figura 47 - Superfície das amostras após ensaio de hemocompatibilidade: (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO 0,07 M Sr (G3) e (d) Porcentagem da área de cobertura das plaquetas na superfície das amostras de cada grupo.	110
Figura 48 - Aspecto da superfície das amostras mostrando a coagulação da superfície, sendo Ctrl o Grupo 1 (TZM), PEO o Grupo 2 (TZM PEO) e Sr o Grupo 3 (TZM PEO 0,07 M Sr).	110

Figura 49 - Micrografias da superfície da liga Ti15Zr15Mo após oxidação por plasma eletrolítico, sendo considerado os grupos: (a) Controle (G1 – TZM - Amostra lixada de #100 a #1500), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO Calcinado (G3) e (d) TZM PEO com 0,07 M Sr Calcinado (G4), com ampliação de 5kx.	113
Figura 50 - Resultados obtidos após caracterização da superfície difração de raios X, conforme grupos indicados na legenda.	116
Figura 51 - Resultados obtidos na análise do ângulo de contato, por meio do método de gota sêssil, considerando os meios ar, água e superfície da liga Ti15Zr15Mo: (a) Grupo 1 (G1); (b) Grupo 2 (G2); (c) Grupo 3 (G3); (d) Grupo 4 (G4).	117
Figura 52 – Resultados da caracterização por espectroscopia Raman dos grupos mencionados na legenda do gráfico.....	118
Figura 53 - Gráficos resultantes da análise por microscopia confocal dos grupos: (a) TZM, (b) TZM PEO, (c) TZM PEO Calcinado e (d) TZM PEO 0,07 M Calcinado.	119
Figura 54 - Análise da atividade microbiológica por meio de caracterização por MEV. Os grupos de estudo são: (a) TZM (G1); (b) TZM PEO (G2); (c) TZM PEO Calcinado (G3) e (d) TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (G4).	121
Figura 55 - Análise estatística da atividade microbiológica das amostras da liga Ti15Zr15Mo	121
Figura 56 - Micrografias MEV mostrando a morfologia das células após 24 h de cultura celular: (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO Calcinado (G3), (d) TZM PEO 0,07 M Calcinado (G4), com ampliação de 3 kx.....	122
Figura 57 - Gráfico com resultados do ensaio de adesão, com a porcentagem das células aderidas por cm ² da superfície das amostras de cada grupo: TZM (G1), TZM PEO (G2), TZM PEO Calcinado (G3) e TZM PEO 0,07 M Calcinado (G4).....	124
Figura 58 - Resultados da análise da viabilidade celular determinada por AlamarBlue®. Os testes foram realizados após (a) 1 dia e (b) 7 dias de incubação, nos grupos de estudo TZM, TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado.....	125
Figura 59 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade com LDH após (a) 1 dia e (b) 4 dias de incubação, nas amostras dos grupos TZM, TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado.....	126
Figura 60 - Resultados dos ensaios vivo/morto dos grupos TZM, TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado: (a) Análise estatística com a quantidade de células mortas após 1 dia e (b) 7 dias de incubação. Imagens de microscopia de fluorescência das células após (c) 1 dia e (d) 7 dias de incubação.	126
Figura 61 - Imagens de microscopia de fluorescência das células coradas com Faloidina/Rodamina, após 1 e 7 dias de cultura celular.	127
Figura 62 - Imagens de microscopia de fluorescência das células adiposas coradas com DAPI e Faloidina/Rodamina, dos grupos (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO Calcinado (G3), (d) TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (G4), (e) gráfico com os resultados dos ensaios ALP.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração atômica em porcentagem da superfície das amostras de Ti15Zr15Mo antes e após tratamento de oxidação por plasma eletrolítico, analisado por EDS.....	99
Tabela 2 - Concentração atômica em porcentagem da superfície das amostras de Ti15Zr15Mo antes e após tratamento de oxidação por plasma eletrolítico, analisado por EDS.....	114
Tabela 3 - Dados obtidos no <i>software</i> Gwyddion relacionados aos resultados da microscopia confocal.	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - História do desenvolvimento das ligas de titânio para aplicações biomédicas.....	37
Quadro 2 - Propriedades do fosfato de cálcio necessárias para aplicações médicas.....	56
Quadro 3 - Grupos de estudo utilizados no Experimento 1.....	69
Quadro 4 - Grupos de estudo utilizados no Experimento 2.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3D	Tridimensional
a.C	Antes de Cristo
AC	Corrente Alternada – <i>Alternating Current</i>
ADSC	Células-tronco Mesenquimais Adultas do Tecido Adiposo
AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i> (Instituto Americano de Ferro e Aço)
ALP	Fosfatase Alcalina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i> (Sociedade Americana para Testes e Materiais)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (infusão cérebro coração)
CSU	<i>Colorado State University</i>
cp	Comercialmente Puro
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Corrente Direta – <i>Direct Current</i>
DRX	Difratometria de Raios X
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EEL	Escola de Engenharia de Lorena
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Comida e Medicamentos)
FEG	Faculdade de Engenharia e Ciências de Guaratinguetá
HA	Hidroxiapatita
hBMSCs	Células progenitoras de medula óssea humana
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>

JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
LDH	Enzima Lactato Desidrogenase
MAO	Oxidação por Micro Arco
MEM	Meio Essencial Mínimo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PFA	Paraformaldeído
PEO	Oxidação por Plasma Eletrolítico
pH	Potencial Hidrogenônico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
Ra	Rugosidade média
Rp	Altura máxima do pico
Rq	Rugosidade quadrática média
Rs	Rugosidade superficial
Rv	Profundidade máxima da cova
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i> (Solução que Simula Fluídos Corporais)
SFB	<i>Society for Biomaterials</i> (Sociedade para Biomateriais)
TZM	Liga Ti15Zr15Mo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Unesp	Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”
UNIFEI	Universidade Federal de Itajubá

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS – BIOMATERIAIS METÁLICOS	28
2.2 TITÂNIO E SUAS LIGAS	34
2.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE BIOMATERIAIS METÁLICOS	41
2.3.1 Oxidação por plasma eletrolítico (<i>plasma electrolytic oxidation</i> - PEO)	43
2.4 CERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO (CaP)	54
2.5 ESTRÔNCIO	58
2.6 IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS BIOLÓGICOS DAS AMOSTRAS.....	61
3 EXPERIMENTO 1	68
3.1 OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	68
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	68
3.2.1 Processamento e obtenção da liga	69
3.2.2 Tratamento de superfície da liga Ti15Zr15Mo	74
3.2.3 Caracterização da superfície da liga Ti15Zr15Mo.....	76
3.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva	76
3.2.3.2 Difração de raios X	77
3.2.3.3 Molhabilidade.....	78
3.2.4 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo – Análise da atividade microbiológica.....	79
3.2.5 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo – Ensaios <i>in vitro</i>	82
3.2.5.1 Viabilidade celular	83
3.2.5.2 Ensaios de adesão e proliferação celular.....	83
3.2.5.3 Análise da hemocompatibilidade e adesão de plaquetas.....	83
4 EXPERIMENTO 2	85
4.1 OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	85
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	85
4.2.1 Processamento e obtenção da liga	86
4.2.2 Tratamento de superfície da liga Ti15Zr15Mo	87
4.2.3 Caracterização da superfície da liga Ti15Zr15Mo.....	88
4.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva	88
4.2.3.2 Difração de raios X	89

4.2.3.3 Molhabilidade.....	90
4.2.3.4 Espectroscopia Raman	90
4.2.3.5 Microscopia Confocal	91
4.2.4 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo	91
4.2.4.1 Análise da atividade microbiológica	92
4.2.4.2 Estudos <i>in vitro</i>	92
4.2.4.3 Ensaio de adesão	93
4.2.4.4 Viabilidade celular	93
4.2.4.5 Ensaio de células vivas/mortas.....	94
4.2.4.6 Teste de citotoxicidade.....	94
4.2.4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal	94
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
5.1 EXPERIMENTO 1	96
5.1.1 Caracterização da superfície da liga Ti15Zr15Mo.....	96
5.1.1.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva	96
5.1.1.2 Difração de raios X	100
5.1.1.3 Molhabilidade.....	101
5.1.2 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo	104
5.1.2.1 Análise da atividade microbiológica	104
5.1.2.2 Ensaio <i>in vitro</i>	106
5.2 EXPERIMENTO 2	111
5.2.1 Caracterização da superfície da liga Ti15Zr15Mo.....	112
5.2.1.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva ...	112
5.2.1.2 Difração de raios X	115
5.2.1.3 Molhabilidade.....	116
5.2.1.4 Espectroscopia Raman	118
5.2.1.5 Microscopia confocal	118
5.2.2 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo	120
5.2.2.1 Análise da atividade microbiológica	120
5.2.2.2 Estudos <i>in vitro</i>	122
6 CONCLUSÃO.....	130
REFERÊNCIAS	133

1 INTRODUÇÃO

A degradação das articulações e os problemas inflamatórios nos ossos afetam milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo que estas questões geralmente requerem cirurgia e substituição. Esses problemas somam metade de todas as doenças crônicas que a população tem sofrido nas últimas décadas (NAVARRO et al., 2008). Atualmente, diversos requisitos necessários para implantes ainda não foram cumpridos, tanto no reparo quanto na regeneração de defeitos ósseos, apesar de existir uma grande variedade de materiais disponíveis comercialmente e muitos outros estarem sob investigação (TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021). Com isso, o estudo no campo dos biomateriais é crucial para a medicina e para a qualidade de vida das pessoas, além de ter um impacto econômico.

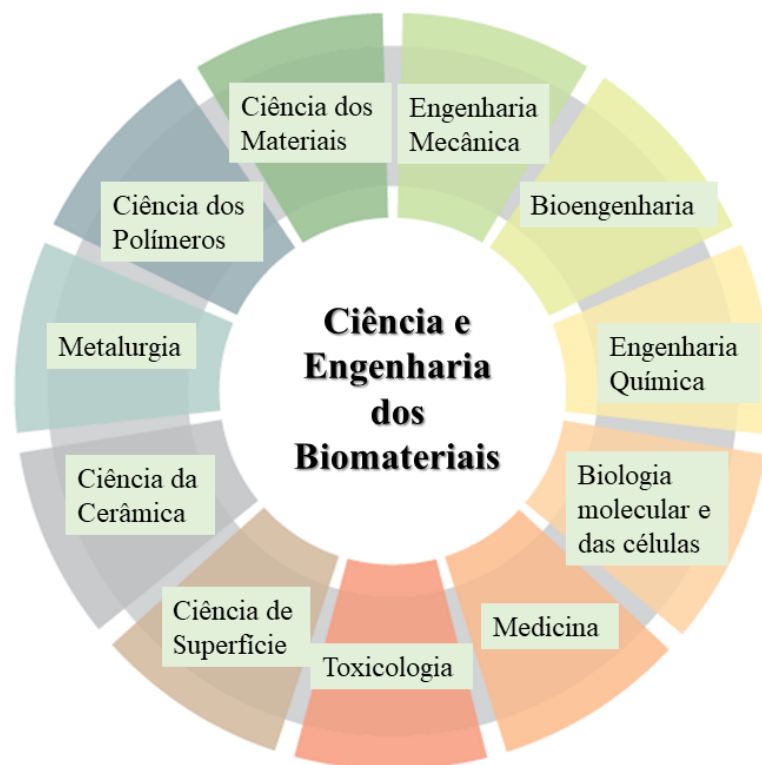
Para aprofundar os estudos sobre biomateriais, é necessário entender a sua definição, que evoluiu ao longo dos anos. Em 1967, o Dr. Jonathan Cohen estabeleceu biomaterial como qualquer material utilizado em implantes, exceto medicamentos e tecidos moles biológicos (MARIN; BOSCHETTO; PEZZOTTI, 2020). Após 2 anos, o termo foi formalmente reconhecido e associado à engenharia de materiais médicos (COHEN, 1967). Em 1974, a Sociedade para Biomateriais (SFB – *Society for Biomaterials*) descreveu biomateriais como substâncias projetadas para a implantação ou incorporação em sistemas vivos (PARK, 1984). Posteriormente, em 1982, a definição foi ampliada para incluir materiais sintéticos ou naturais que tratam, melhoram ou substituem tecidos, órgãos ou funções no corpo humano (BERGMANN, 2013). Em 1986, o professor D. F Williams definiu: “um biomaterial é um material não viável utilizado em aparelhos médicos, com a intenção de interagir com sistemas biológicos (WILLIAMS; DAVID, 1986). E, em 1991, o conceito incluiu o impacto na qualidade de vida das pessoas (*The European Society for Biomaterials – 9ª Conferência Europeia sobre Biomateriais*). A mais recente atualização foi realizada em 2018, no qual acrescenta a ideia de que o biomaterial é projetado para interagir com os sistemas vivos, direcionando procedimentos terapêuticos ou diagnósticos (TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021).

O uso dos biomateriais remonta à pré-história, no qual tem-se evidências de materiais serem utilizados para substituir ou reparar partes do corpo, como por exemplo a ponta de lança embutida no quadril no Homem de Kennewick, cerca de 7000 a.C. Há 4000 anos, os antigos egípcios utilizavam fios de linho para machucados e para facilitar a cicatrização de

feridas, além de aplicar metais preciosos em implantes dentários (RATNER; ZHANG, 2020). A evolução dos biomateriais continuou com práticas como o uso de placas de ouro pelos incas para a reparação de fraturas cranianas e conchas para dentes artificiais pelos maias (ANJARD, 1981; BOBBIO, 1972). Esses procedimentos pioneiros foram realizados sem o entendimento de reações biológicas, segundo Ratner e Zhang (2020), porém foram importantes para mostrar o potencial dos biomateriais bem como a capacidade do corpo humano em se adaptar e acomodar materiais estranhos a ele.

A partir do século XIX, cientistas e médicos começaram a investigar sistematicamente como o corpo humano reage na presença de materiais exógenos, levando ao desenvolvimento do conceito de biocompatibilidade (RATNER; ZHANG, 2020). Seguindo na linha do tempo dos biomateriais, a partir da década de 1960, estudos começaram a definir as propriedades desejáveis para eles (COHEN, 1967). Assim, a pesquisa em biomateriais tornou-se multidisciplinar, integrando diversas áreas de conhecimento para enfrentar novos desafios médicos, conforme pode-se observar na Figura 1.

Figura 1 - Integração entre diversas disciplinas que podem contribuir para a pesquisa em biomateriais.



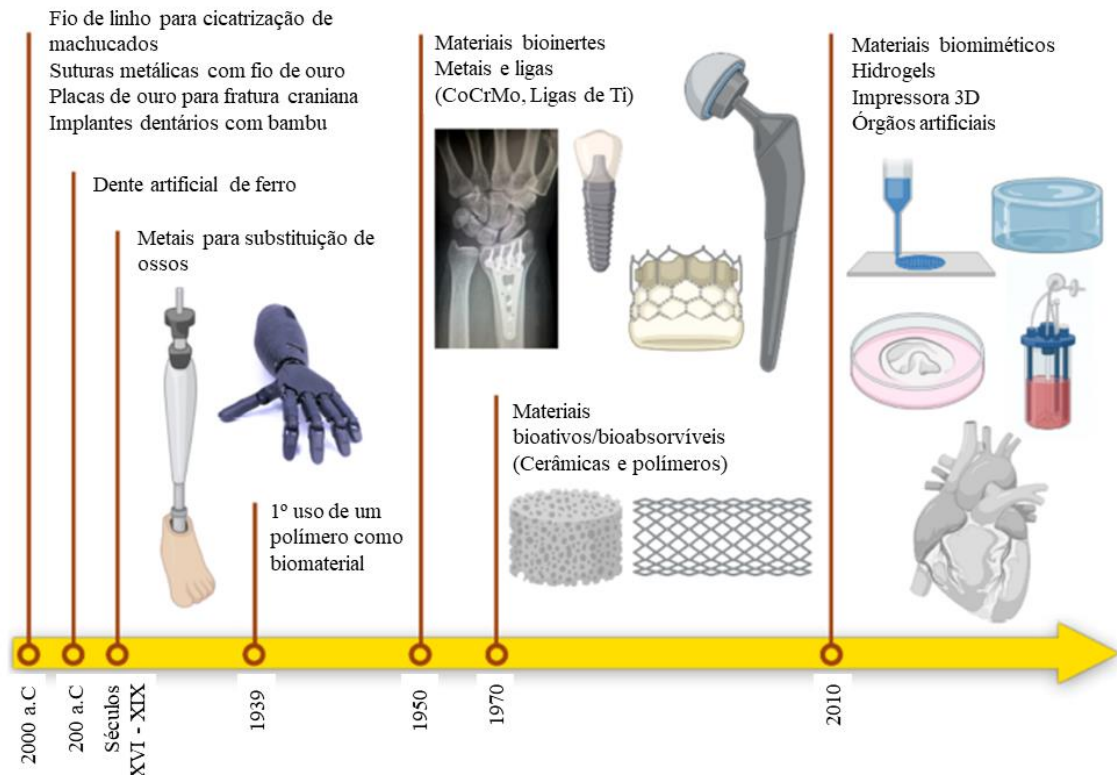
Fonte: adaptado de (RATNER, 2019).

De maneira geral, foram feitos avanços nos estudos dos biomateriais nos últimos 70 anos, no qual os materiais utilizados para propósitos biomédicos têm sido desenvolvidos por

meio de três gerações diferentes: materiais bioinertes (1ª geração), materiais bioativos e biodegradáveis (2ª geração) e materiais projetados para estimular respostas específicas a nível molecular (3ª geração) (HENCH; THOMPSON, 2010; NAVARRO et al., 2008). A primeira geração foca na seleção de materiais inertes, com propriedades semelhantes às dos tecidos vivos, minimizando a resposta imune do hospedeiro. Segundo Legeros (2008), os materiais bioinertes não estimulam a formação óssea, mas sim a formação de tecido fibroso, portanto, não se conectam diretamente ao osso e geram uma interface biomaterial-osso fraca. Na segunda geração, surgiram materiais bioativos e bioabsorvíveis, que interagem com o tecido vivo para melhorar a resposta biológica ou se degradam enquanto o tecido se regenera, respectivamente. A terceira geração combina bioatividade e biodegradabilidade, com o desenvolvimento de materiais que estimulam respostas celulares específicas e regeneração de tecidos. A tendência futura é integrar a química e a biologia dos biomateriais, buscando maior bioatividade e biocompatibilidade.

Na Figura 2, observa-se uma linha do tempo ilustrando os marcos mais importantes na história dos biomateriais. Quando se considera as gerações, de acordo com Zaokari, Persaud e Ibrahim (2020), esta classificação depende da aplicação no qual o biomaterial está sendo estudado, pois cada geração tem a sua funcionalidade e representa uma evolução nos requisitos e propriedades dos materiais envolvidos. Portanto, os materiais que cada nova geração apresenta não necessariamente substituem o uso dos materiais das gerações anteriores. Por exemplo, hoje em dia ainda são utilizados biomateriais da 1ª geração em diversas aplicações e os da 3ª geração podem agregar novas possibilidades de tratamentos e aplicações. Assim, essas gerações não devem ser interpretadas cronologicamente, mas sim de modo conceitual.

Figura 2 - A história dos biomateriais: da substituição à regeneração.



Fonte: adaptado de (TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021).

Dessa forma, cresceu a demanda para produzir biomateriais de elevada qualidade, com aplicação comercial. Especificamente no mercado de biomateriais para implantes ortopédicos, há uma tendência até 2030 de aumentar 7,5% do mercado global, considerando que 1 a cada 6 indivíduos terá 60 anos ou mais no mundo todo (ORTHOPEDIC, 2024). Alguns destes materiais são utilizados como implantes, placas ósseas e aparelhos dentários. Entretanto, o alto custo de fabricação e requisitos rigorosos permanecem um desafio. De maneira a tentar superar esses obstáculos, o titânio e suas ligas tornaram-se populares como materiais metálicos médicos para serem utilizados em implantes dentários e ortopédicos devido à sua resistência mecânica, resistência à corrosão e excelente biocompatibilidade (CHEN et al., 2020; KIRMANIDOU et al., 2016; ZHANG; CHEN, 2019). Nos últimos anos, considera-se que eles ocupam aproximadamente 40% do mercado de implantes biomédicos (AVCI et al., 2017). Entretanto, por eles serem biologicamente inertes e também a baixa bioatividade dos implantes baseados no titânio o tornam desafiadores para promover o crescimento ósseo diretamente na superfície, que pode levar à osseointegração insuficiente entre a superfície do implante e o tecido ósseo do hospedeiro, resultando em falhas e até à perda do implante (LLOPIS-GRIMALT et al., 2020; ZHANG et al., 2018).

Um meio efetivo de solucionar este problema é preparando revestimentos bioativos na superfície dos implantes de titânio e suas ligas (SMIRNOV et al., 2020; ZHANG et al., 2022). Estes revestimentos podem gerar diferentes resultados, tais como: forte adesão mecânica entre o osso e o implante, osteoindução e osteocondução melhoradas, maior resistência à corrosão, bioatividade, biocompatibilidade e tempo menor de cicatrização (SASIKUMAR et al., 2019). Segundo Rokosz (2022), a engenharia de superfície é um tópico interdisciplinar e times multidisciplinares têm trabalhado em novos materiais e revestimentos com propriedades otimizadas em laboratórios por todo o mundo.

Em específico, a bioatividade pode ser alcançada a partir de duas abordagens: a partir da formação de um revestimento na superfície com uma cerâmica bioativa, tal como a hidroxiapatita (HA), empregando técnicas com custo relativamente baixo como oxidação por plasma eletrolítico (PEO), ou a partir da modificação de superfície do metal para induzir proteínas, adesão celular e outro tecido ou interações no material. Na segunda abordagem são utilizados vários processos que modificam quimicamente para obter apatita ou outra camada de fosfato de cálcio (CaP) na superfície do metal, tais como tratamento termoquímico e pré-calcificação da superfície metálica por meio imersões sucessivas em soluções de Na_2HPO_4 e $\text{Ca}(\text{OH})_2$, ambas técnicas geram uma ligação química direta entre o substrato e o revestimento. Estes métodos têm sido desenvolvidos principalmente para o titânio comercialmente puro e suas ligas (NAVARRO et al., 2008; ZAOKARI; PERSAUD; IBRAHIM, 2020).

Assim, estudos sobre as ligas de titânio têm sido focados nas ligas β devido às suas propriedades mecânicas serem superiores às demais quando o objetivo é a aplicação biomédica, tais como baixo módulo de elasticidade, alta resistência mecânica, boa conformabilidade e alta ductibilidade (CORREA et al., 2015; EISENBARTH et al., 2004). Pesquisadores têm investigado modificações de superfície de ligas de titânio por meio da incorporação ou deposição de elementos bioativos na superfície do material para ajudar a acelerar o processo de osseointegração (WEN et al., 2015). Uma das opções utilizadas é a deposição de hidroxiapatita (HA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), pois possui excelente osseointegrabilidade e propriedades químicas estáveis. A sua composição química e estrutura cristalina são similares à apatita do osso humano, tornando-a um material promissor para a substituição e reconstrução óssea (ZHANG et al., 2022). Estudos afirmam que a preparação de revestimentos bioativos de HA na superfície do implante pode promover a osseointegração (BAI et al., 2018).

Outra opção além da hidroxiapatita é o estrôncio, que tem apresentado efeitos benéficos em estudos com pacientes com osteoporose e também é autorizado pela FDA (*Food and Drug Administration*) como medicamento eficiente para tratar doenças. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o Sr é um dos elementos bioativos mais potentes para o metabolismo ósseo. Dentre eles, Wen et al. (2015) comprovam que ele é um candidato com alto potencial para estimular a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, inibir a atividade e diferenciação dos osteoclastos *in vitro* e promover a cicatrização óssea ao aumentar a formação óssea e reduzir a reabsorção óssea. No entanto, para o nosso conhecimento, é raro usar ligas de Ti com Sr em conjunto com micro ou nanotopografia para investigar a formação óssea e a osseointegração em pesquisas atuais.

De acordo com a literatura científica, extensas investigações têm sido realizadas sobre o potencial da oxidação por plasma eletrolítico (PEO) para a geração de revestimentos com aplicações funcionais (CARDOSO et al., 2023; CHEN et al., 2019, 2021; CHENG et al., 2012; CHUNG et al., 2013; CORREA et al., 2018; CUI et al., 2021; DING et al., 2022; FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2021; FATTAH-ALHOSSEINI; MOLAEI; BABAEI, 2020; GUAN et al., 2021; KHORASANINAN et al., 2011; ROSKOSZ et al., 2020a, 2020b, 2020c, 2020d, 2022; WANG et al., 2015). Esta técnica também é conhecida como oxidação por micro arco (MAO). A base para grande parte deste trabalho tem sido a exploração da área de superfície específica dos revestimentos PEO, devido aos seus elevados níveis de porosidade, principalmente para revestimentos à base de titânio. A ideia de aumentar a área específica da superfície é focada em permitir uma ligação mais forte com o tecido ósseo, promovendo uma camada porosa de PEO na superfície (CLYNE; TROUGHTON, 2019). Diversos estudos comprovaram que esses efeitos são significativos e que as superfícies PEO são promissoras em termos de biocompatibilidade (DICU et al., 2011; KOEGLER; GRIFFITH, 2004; ROBINSON et al., 2011; WHITESIDES, 2004).

Nos últimos anos, o nosso grupo tem estudado modificação de superfície em ligas de titânio para aplicações biomédicas, focando em propriedades de volume e de superfície mais adequadas a esta aplicação (CAPELLATO et al., 2012; ESCADA; NAKAZATO; CLARO, 2017; RANGEL et al., 2018). A liga Ti15Zr15Mo apresenta propriedades de volume, sendo que a oxidação anódica com a formação de nanotubos de TiO₂ mostrou-se uma técnica eficiente para a modificação da superfície desse material (KONATU et al., 2023). Buscando dar continuidade a esse estudo, a pesquisa aqui desenvolvida teve como desafio propor o uso da técnica de oxidação por plasma eletrolítico (PEO) como uma alternativa ao tratamento de

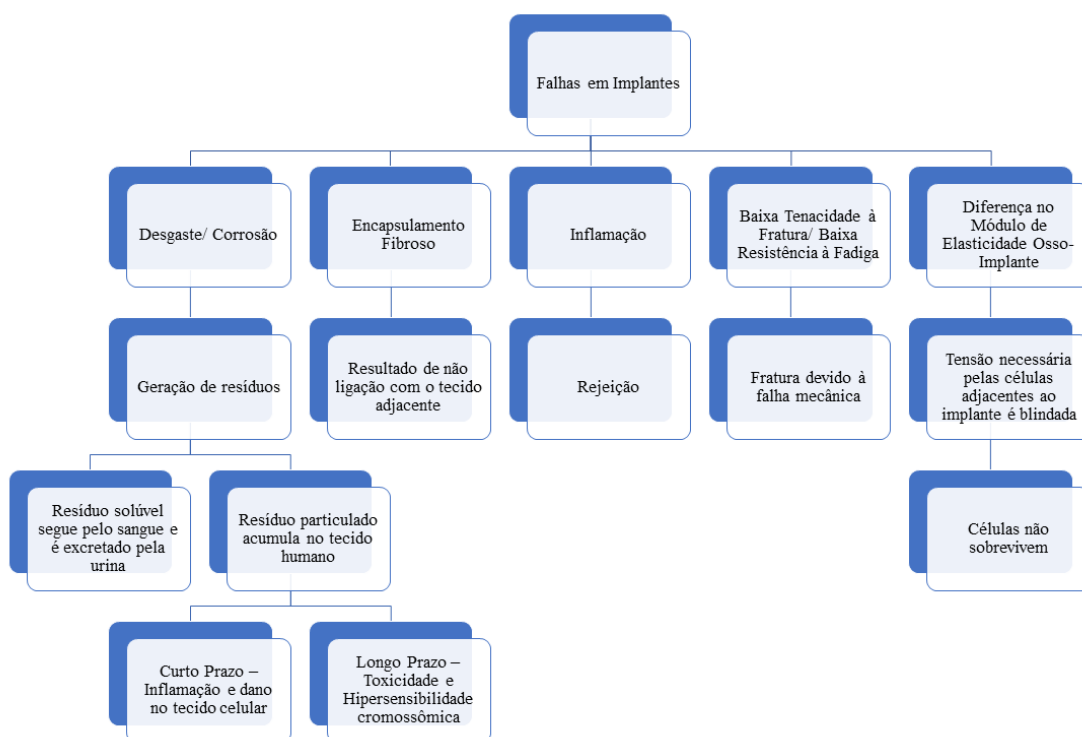
superfície dessas ligas, devido a reprodutibilidade desta técnica e possibilidade de aplicação comercial. Parâmetros como eletrólito e calcinação do material após modificação da superfície foram avaliados nesse trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS – BIOMATERIAIS METÁLICOS

A anatomia e a estrutura do corpo humano decidem e restringem as características dos implantes. Portanto, o equilíbrio mecânico e químico dos implantes biomédicos, assim como a sua biocompatibilidade com os tecidos ósseos e fluidos corporais, são críticos para o seu sucesso (JING et al., 2020). Além disso, conforme Thukkaram et al. (2020), integração óssea e prevenção de infecções microbianas são fundamentais para que o implante seja bem sucedido. Segundo Davis et al. (2022), no caso de falha no implante, há evidências que indicam quando o processo da perda dele começa, como irritações sistêmicas e reações alérgicas constantes, de acordo com a Figura 3. Com isso, fica difícil a pessoa ter uma boa qualidade de vida e é necessário encontrar soluções para evitar o transtorno ao ser humano.

Figura 3 - Possíveis causas de falhas em implantes, que levam à cirurgia de revisão.



Fonte: adaptado de (DAVIS et al., 2022).

De acordo com Cardoso et al. (2023), dentre os problemas que podem causar falhas em implantes, as inflamações merecem maior atenção porque o implante é um corpo estranho ao corpo humano, assim aumenta o risco de propagação, adesão de bactérias e infecções,

devido à baixa resistência gerada durante a cirurgia para inserir este material. Fattah-Alhosseini et al. (2020) afirma que quando ocorre a falha em implantes, as infecções são a maior causa de mortalidade nos humanos. Segundo Heuer et al. (2007), uma vez que a infecção ocorre, as bactérias aderem e tendem a acumular em uma matriz polimérica que elas mesmas produzem para formar um biofilme na superfície do implante. O problema deste biofilme é que as células presentes nele são como uma barreira que as protegem contra a ação de agentes bactericidas (antibióticos), consequentemente, essas infecções podem levar à falha prematura do implante, resultando em infecções crônicas, na necessidade de cirurgia de revisão e altos custos com a saúde (THUKKARAM et al., 2020; WANG et al., 2020; YIN et al., 2022).

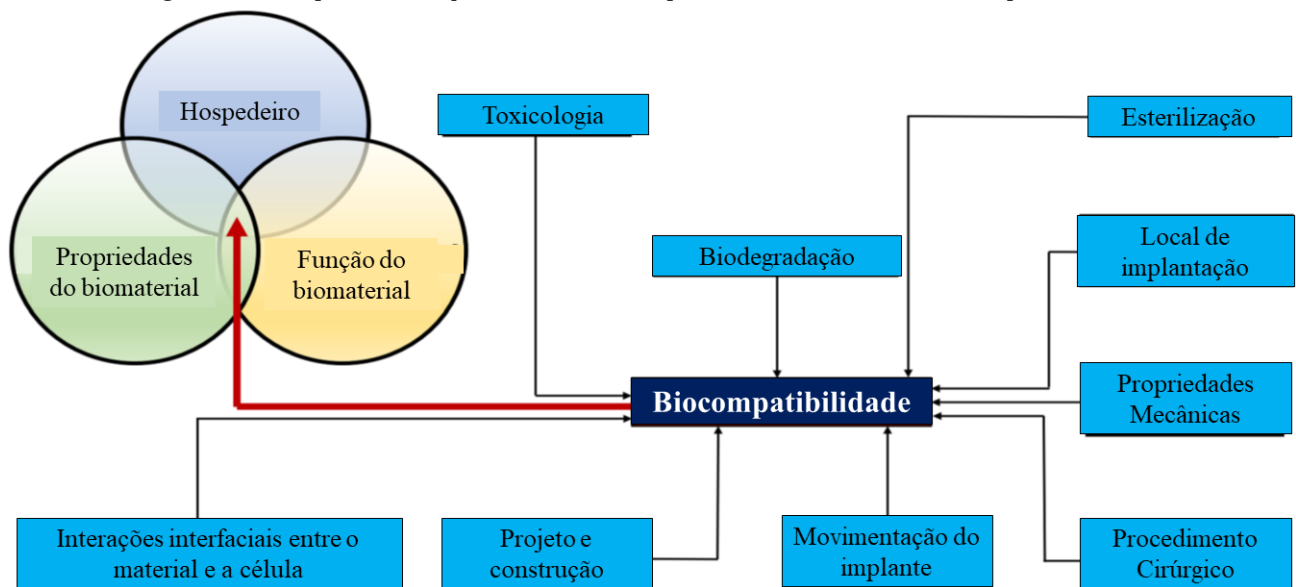
O termo biocompatibilidade é importante para entender a diferença entre materiais e biomateriais, facilitando a escolha de qual é o melhor material para evitar falhas em implantes, conforme a sua função no corpo humano. Segundo Ratner (2019), a definição de biomateriais como materiais especificamente concebidos para uso como implantes biomédicos foi levantada quando se reconheceu que eles devem possuir uma função fundamental característica: a biocompatibilidade. Conforme Williams (1999), implantes biomédicos são a emulação biomimética de partes do corpo humano, adotados para tratar estrutura biológica perdida ou danificada, readquirindo uma estrutura original e funcionando eficientemente.

No início, a biocompatibilidade estava associada principalmente às substâncias biologicamente inertes. Por volta da década de 1970, a bioatividade foi descoberta pela primeira vez e a definição de biomateriais foi consequentemente ampliada. Atualmente, também inclui materiais de origem biológica e materiais biológicos (TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021). Conceitos fundamentais relacionados à biocompatibilidade estão disponíveis no FDA, no qual considera a biocompatibilidade do aparelho todo e não apenas de seus componentes. Segundo Vince, Hunt e Williams (1991), a definição de biocompatibilidade é a compatibilidade do material quando em contato com o meio biológico, sendo que essa interação deve ser a longo prazo, sem causar influências locais ou sistêmicas indesejadas e o material deve realizar funções específicas conforme a sua aplicação. De acordo com Davis et al. (2022), em estudos mais recentes sobre o tema, o ideal para um material biocompatível é gerar uma resposta celular superior e terapia otimizada em meio a um uso específico.

Com isso, pode-se afirmar que as características físicas, químicas e mecânicas são fundamentais para que um material seja biocompatível (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG,

2018). Além disso, para um desempenho clínico satisfatório, a biocompatibilidade de um implante biomédico precisa ser apoiada fundamentalmente pelas propriedades físicas, mecânicas e de degradação do implante, esterilização - com o objetivo de liberar a superfície de todos os tipos de micro-organismos, aspectos toxicológicos - exames e tratamentos de qualquer toxina ou substância intoxicante, procedimento cirúrgico, local de implantação e capacidade de carga, como pode-se observar na Figura 4 (CROWLEY; PEMBROKE; BIRKINSHAW, 2010). Por exemplo, uma prótese de quadril precisa ser rígida e não se espera que falhe antes de 20 anos após sua implantação, independentemente do tipo de carga que ela irá suportar durante este período (DAVIS et al., 2022).

Figura 4 - Principais fatores que afetam a biocompatibilidade funcional de um implante biomédico.



Fonte: adaptado de (Davis et al., 2022).

Embora a definição da biocompatibilidade seja precisa, ela não oferece informações sobre os mecanismos de biocompatibilidade, nenhuma instrução sobre como testar a biocompatibilidade e nenhum caminho para a otimização ou melhoria da biocompatibilidade (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018; RATNER, 2019). Dessa forma, a avaliação da biocompatibilidade é um procedimento complexo que tem como objetivo verificar a capacidade de um dado material para evitar reações adversas e também realizar corretamente a função pretendida quando em contato com o meio biológico ou inserida nele (TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021).

De maneira a examinar a biocompatibilidade, autores o fazem por meio da implantação *in vitro* e *in vivo*, normalmente por via subdérmica ou intramuscular (DAVIS et

al., 2022). Segundo Rasouli, Barhoum e Uludag (2018), a análise de biocompatibilidade de implantes micro e nanoestruturados envolve o seguinte:

- Estudos *in vitro*: realizados na superfície em questão de rugosidade, molhabilidade, composição, estrutura cristalina, habilidade de formar hidroxiapatita em SBF (*Simulated Body Fluid*), quantidade e espessura das camadas de revestimento, estabilidade mecânica e resistência à corrosão;

- Ensaios *in vivo*: análise microscópica da qualidade do tecido ao redor do implante, quantificação da resistência mecânica após a osseointegração do implante, resistência à corrosão, avaliação da toxicidade, resistência à flexão, densidade, dureza, média do tamanho de grão, microdureza, módulo de elasticidade, ensaio de inércia e análise dos ensaios clínicos humanos.

Outros autores explicam que o termo “biocompatibilidade” inclui não apenas compatibilidade biológica, mas também a avaliação funcional de todo o sistema implantável. Há diversos casos de materiais biologicamente compatíveis que não atendem a verificação funcional. Um exemplo é o Teflon (politetrafluoretileno), pois não provoca reação biológica em particular e, portanto, pode ser considerada compatível biologicamente. Porém, quando utilizado para substituir ossos em articulações, se fragmenta e gera respostas celulares indesejadas que corroem progressivamente as estruturas adjacentes. Assim, o Teflon não é compatível funcionalmente em relação a esta aplicação. De fato, há diversos aspectos que determinam a biocompatibilidade de um material, considerando a duração do contato com seus homólogos biológicos: composição química, comportamento mecânico e formato físico (LEE; EISIG; PERRINO, 2021).

No caso específico de materiais e aparelhos que estão em contato com o sangue, o termo hemocompatibilidade é utilizado para enfatizar a ausência de trombose e hemólise. Hemocompatibilidade é uma característica da biocompatibilidade que descreve a compatibilidade de materiais implantados com o sangue que circula no organismo, enquanto o aparelho médico mantém contato com o sangue sem reações adversas e sem liberar componentes no sangue ou gerar consequências indesejáveis (CROWLEY; PEMBROKE; BIRKINSHAW, 2010). De maneira geral, nenhum implante pode garantir absoluta compatibilidade com o hospedeiro, pois todos utilizados são corpos estranhos e responsáveis por uma reação inevitável após cirurgia. Esta reação é devido à inflamação não crônica para atingir a restauração bem sucedida da funcionalidade do tecido ou do órgão após completar o seu processo de cicatrização (TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021).

Em suma, a biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade do aparelho médico ou material realizar funções desejáveis com relação à terapia médica, induzindo uma resposta do hospedeiro que seja apropriada para uma aplicação específica e interagindo com sistemas vivos sem causar nenhum risco de dano, toxicidade ou rejeição pelo sistema imune e efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis ou inapropriados. Esta definição consta na ISO 10,993 – 1: 2018 na Avaliação Biológica de Aparelhos Médicos – Parte 1.

Com isso e também devido à validade dos materiais, atualmente os biomateriais e materiais biomédicos têm durabilidade limitada, que é geralmente muito menor do que a expectativa de vida do paciente. Por exemplo, a durabilidade média de uma prótese total do quadril é de 15 anos, de uma válvula mecânica do coração é de 30 anos, enquanto uma prótese de origem biológica dura 12 anos (TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021). Por conseguinte, ainda é necessário muito progresso nos estudos para melhorar tanto a biocompatibilidade quanto a durabilidade dos materiais.

Desde os primórdios, há a busca pelas melhorias nos materiais para aplicações biomédicas, seja para aumentar a durabilidade ou otimizar suas propriedades. Em se tratando de materiais metálicos, a primeira cirurgia bem sucedida foi realizada no século XX em aplicação biomédica e os biomateriais utilizados foram aço inoxidável e ligas de cobalto-cromo. Ao longo do tempo, novas ligas com outros materiais foram desenvolvidas e considera-se que o titânio e suas ligas começaram a ser estudadas em 1940, bem como as ligas de níquel e titânio (NiTi) em 1960. Com isso, foi criada uma nova gama de aplicação em biomateriais, no campo da ortopedia, devido ao seu comportamento único de propriedades químicas e mecânicas. Porém, uma desvantagem das ligas NiTi é o efeito alergênico do níquel que tem dificultado seu uso (NAVARRO et al., 2008; ZAOKARI; PERSAUD; IBRAHIM, 2020).

Seguindo na linha do tempo em relação aos materiais metálicos, em 1950, foi realizada por Charnley a primeira cirurgia bem sucedida de substituição de prótese no quadril, utilizando prótese de aço inoxidável (CHARNLEY, 1960). Ainda nos dias de hoje, o aço inoxidável mais utilizado em aplicações clínicas é o AISI 316L. Este material tem baixo custo, fácil processamento e alta disponibilidade em relação aos demais. Apesar disso, seu uso em ortopedia é restrito devido às propriedades mecânicas superiores e melhores resistência à corrosão das ligas de Co-Cr e de titânio. Além disso, o uso do aço inoxidável em articulações, como o quadril, foi descartado devido à sua baixa resistência ao desgaste, propriedade

extremamente importante para esta aplicação que tem como requisito a movimentação e fricção da região (NAVARRO et al., 2008).

Consequentemente, a liga Co-Cr foi introduzida para aplicação em próteses de quadril, pois exibem excelente resistência à corrosão, combinadas com boa resistência à fadiga e suas propriedades mecânicas também são superiores em relação ao aço inoxidável (MCKEE; WATSON-FARRA, 1966). Além disso, possui resistência ao desgaste, propriedade que o titânio e suas ligas comumente não têm. Uma das principais desvantagens destas ligas é ter um alto módulo elástico (220-230 GPa), quando comparada à do osso cortical (20-30 GPa). Assim, o metal quando em contato com o osso leva a maior parte da carga, produzindo *stress shielding* no osso adjacente. Com isso, a falta de estímulos mecânicos no osso pode induzir a sua reabsorção, o que levará a eventual falha e afrouxamento do implante, de acordo com Navarro et al. (2008).

O *stress shielding* ocorre quando um aparelho metálico está em contato com o osso e é caracterizado pela adaptação do osso à distribuição de tensões, resultando tanto no afinamento do osso (remodelação externa) quanto no aumento da porosidade (remodelação interna). Quando as condições de carregamento diminuem, gera uma atrofia ou perda óssea devido à maior dureza do material. Em contrapartida, quando a carga aumenta, produz osso mais denso. Em outras palavras, a presença do implante altera o processo fisiológico de remodelamento do tecido ósseo e pode causar reabsorção. O processo de reabsorção pode levar a um maior risco de falha do implante e de fraturas, gerando a necessidade de cirurgia de revisão, aumentando as complicações e os custos (NAGELS; STOKDIJK; ROZING, 2003; RAFFA et al., 2021; TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021).

Segundo Todros, Todesco e Bagno (2021), podem haver duas abordagens para limitar o efeito *stress shielding*. A primeira é investigar a geometria e o formato do material, com atenção especial às características de superfície. A segunda é selecionar propriamente o material conforme cada aplicação, dependendo das suas propriedades. Por exemplo, no caso de implantes ortopédicos, leva-se em consideração o módulo de elasticidade, no qual o valor para o osso varia entre $6,9 \pm 4,3$ GPa e $25,0 \pm 4,3$ GPa, assim o material deve ter elasticidade próxima à do tecido ósseo para evitar ou diminuir o efeito *stress shielding*.

De maneira a tentar solucionar esta questão, o titânio é um material biocompatível que é extensivamente utilizado em aplicações como biomateriais, especificamente para ancoragem óssea em implantes dentários e ortopédicos, similar à osteogênese (NAJI CHABUK; SALMAN AL-MURSHDY; DAWOOD, 2021). Ele tornou-se um material de grande

interesse na biomedicina devido às suas excelentes propriedades, que incluem um valor moderado do módulo de elasticidade (em média 110 GPa), boa resistência à corrosão e baixa densidade (4700 kg/m^3). Essas propriedades melhoram significativamente o comportamento a longo prazo do dispositivo implantado, diminuindo o risco de afrouxamento e falha.

2.2 TITÂNIO E SUAS LIGAS

O titânio foi descoberto em 1791 por um mineralogista amador chamado William Gregor, que encontrou este elemento na areia ferromagnética, chamada de ilmenita. Posteriormente, em 1795, o titânio foi identificado pelo químico alemão Martin Heinrich Klaproth, no qual nomeou “titânio” em homenagem aos titãs da mitologia grega, conhecidos como os filhos poderosos da Terra. Apesar do titânio puro ser um dos metais mais abundantes da crosta e litosfera terrestre, só pôde ser isolado em grande quantidade após a invenção do processo de Kroll, em 1946 (LUTJERING; WILLIAMS, 2013). Ao longo dos anos, com avanços na pesquisa pós segunda guerra mundial tornaram possível a aplicação deste elemento em aparelhos dentais e para cirurgias (KIRMANIDOU et al., 2016a).

O titânio é um elemento alotrópico e isso significa que existe em mais de uma forma cristalográfica. À temperatura ambiente, a sua estrutura cristalina é hexagonal compacta (fase α) e, a partir de $882,5^\circ\text{C}$, sua estrutura se transforma em cúbica de corpo centrado (fase β) (XAVIER et al., 2017). A temperatura de transformação β -*transus* é definida como a menor temperatura de equilíbrio no qual o material é 100% β e fortemente dependente dos elementos intersticiais (oxigênio, nitrogênio e carbono – α -estabilizadores – aumentam a temperatura *transus*), do hidrogênio (β -estabilizador – diminui a temperatura de transformação), das impurezas metálicas e elementos de liga (aumentam ou diminuem a temperatura de transformação). Os elementos de liga geralmente podem ser classificados em α ou β -estabilizadores (DONACHIE, 2000).

Diversos elementos metálicos estabilizam a fase β nas ligas de titânio a baixas temperaturas, tais como o Fe, V, Ta, Nb, Mo, Ni, Cr e Cu. Por sua vez, os elementos α -estabilizadores favorecem esta fase do titânio na liga ao aumentar a temperatura de transformação (Al, O e N). As ligas de titânio aplicadas como biomaterial incluem não apenas os elementos β -estabilizadores, mas também aqueles que favorecem as propriedades mecânicas e de corrosão do biomaterial, por exemplo o Zr (α e β estabilizador com

propriedades isomorfas) (EISENBARTH et al., 2004). Assim, é comum classificar as ligas de titânio em relação às fases predominantes existentes nelas: α , quase- α , $\alpha + \beta$, quase- β e β .

Como o elemento de liga zircônio pertence à mesma família do titânio na tabela periódica, seu uso em ligas de titânio tem crescido na literatura (VICENTE et al., 2014). Devido à sua adição no sistema Ti-Zr não afetar a transformação alotrópica do Ti, é considerado um elemento neutro (KURODA; BUZALAF; GRANDINI, 2014). Porém, em um sistema ternário ou quaternário com Mo ou Nb, o Zr não é mais neutro e começa a se tornar um β -estabilizador (KURODA et al., 2019; XAVIER et al., 2017). Existem diversos estudos com as ligas de Ti com o Zr de elemento de liga, por exemplo Kuroda et al. (2020) adicionaram diferentes concentrações de Zr ao sistema binário Ti₂₅Ta e observaram que a adição do Zr diminui a temperatura de transformação alotrópica do Ti. Em estudos mais recentes de Kuroda et al. (2023), concluíram que a liga Ti₂₅Ta₂₅Zr possui potencial para aplicações biomédicas e estudaram a influência na temperatura do tratamento térmico após modificação de superfície com PEO.

Em se tratando do elemento de liga molibdênio, tem propriedades mecânicas compatíveis à aplicação biomédica, boa citotoxicidade e é um forte estabilizador da fase β em comparação aos outros elementos (VERISSIMO et al., 2014). Concentrações de Mo maiores que 10% em peso estabilizam a fase β . Existem poucos estudos na literatura sobre a atividade biológica das ligas β -Ti contendo Mo em várias proporções ou em adição a outros elementos não tóxicos. E, como novas ligas de titânio estão sendo estudadas para a próxima geração de implantes metálicos para garantir boa compatibilidade com o osso (NEACSU et al., 2015), pesquisas com a liga TiMo concluíram que ela apresenta boa biocompatibilidade em relação à citotoxicidade e resposta favorável *in vivo* a curto prazo (ALVES CLARO et al., 2018).

Estudos com a liga binária TiMo mostram que a quantidade de molibdênio influencia na morfologia da superfície das amostras, após modificação por anodização, devido aos constituintes da camada de óxido de TiO₂ (KONATU et al., 2023). Recentemente, foram desenvolvidas pesquisas com a liga ternária Ti₃₀Nb₅Mo, no qual foi obtida fase β , baixo módulo de elasticidade e dureza. Porém, os resultados ainda não foram suficientes para obter melhor resistência ao desgaste do que do Ti cp (CARDOSO et al., 2023). Além disso, o efeito dos elementos substitucionais na microestrutura e no comportamento mecânico da liga ternária Ti₁₅Zr₁₅Mo (TZM) foi estudado por Correa et al. (2018). Os autores concluíram que esta liga apresenta formação equiaxial do grão e grande potencial para uma possível aplicação biomédica devido à combinação da fase β com suas propriedades.

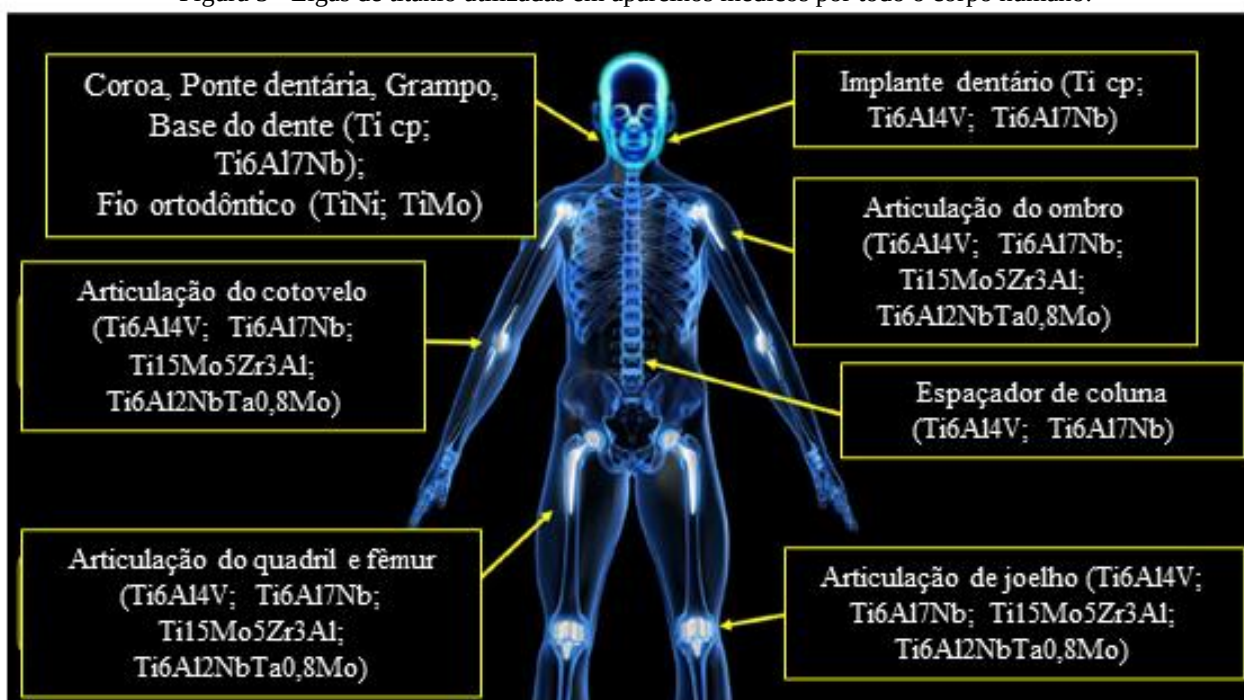
Portanto, o titânio e suas ligas têm sido estudados devido às suas características consideradas adequadas para sua aplicação dentro do corpo humano. Propriedades como baixa densidade e módulo de elasticidade, ductibilidade, alta resistência mecânica e resistência à corrosão, e boa biocompatibilidade estão entre os fatores importantes que tornam o Ti e suas ligas interessantes para uma extensa gama de aplicação em diversas indústrias, tais como aeroespacial, automotiva, química e biomédica. Além disso, a formação espontânea de uma fina camada passiva de óxido, de espessura entre 1,5 a 10 nm, na superfície do titânio e suas ligas como resultado de exposição no ar à temperatura ambiente, protege este material contra oxidação, degradação e corrosão, ademais torna este material mais biocompatível. Por outro lado, aplicações tribológicas desses materiais são limitadas devido à baixa dureza da superfície e resistência ao desgaste, além de terem alto custo (DAVIS et al., 2022; FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2018; LIU et al., 2015; LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014; NAJI CHABUK; SALMAN AL-MURSHDY; DAWOOD, 2021; NAVARRO et al., 2008; RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018; WANG et al., 2015).

Como mencionado acima, o titânio é conhecido por ser um material altamente biocompatível, o que significa que a titânia é biologicamente benigna, visto que todos os metais de titânio possuem uma camada de óxido nativa na sua superfície, normalmente uma das formas do TiO_2 (YANG et al., 2004). Esta camada de óxido TiO_2 pode apresentar formas cristalinas diferentes: anatase (tetragonal), rutilo (tetragonal) e broquita (ortorrômbica). Segundo Cui et al. (2009), estudos reportaram que as estruturas anatase e rutilo têm a habilidade de formar hidroxiapatita, que é um material bioativo.

Atualmente, as ligas de titânio mais comuns na biomedicina são o titânio comercialmente puro (Ti cp), tipo 4 (ASTM F67) e a liga Ti6Al4V (ASTM F136), de acordo com Navarro et al. (2008). Porém, conforme mencionado anteriormente, elas têm sido estudadas há muitos anos para serem aplicadas como biomateriais, segue na Figura 5 e no Quadro 1 um resumo da história do desenvolvimento do Ti e suas ligas. No caso do Ti cp, existem quatro tipos de acordo com a quantidade de oxigênio presente. O tipo 4 contém a maior porcentagem de oxigênio ($>0,4\%$) e, conseqüentemente, a maior tensão ao escoamento e à tração. De maneira geral, o Ti cp com fase α é utilizado em implantes dentários, enquanto a liga Ti6Al4V com fase $\alpha + \beta$ é comumente aplicada na ortopedia. Os elementos de liga Al e V estabilizam a microestrutura $\alpha + \beta$ e melhoram as propriedades mecânicas, em relação ao Ti cp, podendo até duplicar o valor de tensão de escoamento e à tração. Essas propriedades podem ser moduladas pelo tratamento térmico. Apesar do Ti e suas ligas apresentarem uma

combinação interessante de propriedades para serem aplicadas como biomaterial, seu processamento não é fácil. Além disso, estudos indicam que os elementos V e Al podem ser citotóxicos, o que preocupa os pesquisadores e abre precedente para desenvolver novas composições de ligas de titânio. A nova geração das ligas de titânio tem sido investigada e ainda não é comercializada (NAJI CHABUK; SALMAN AL-MURSHDY; DAWOOD, 2021).

Figura 5 - Ligas de titânio utilizadas em aparelhos médicos por todo o corpo humano.



Fonte: adaptado de (SARRAF et al., 2022).

Quadro 1 - História do desenvolvimento das ligas de titânio para aplicações biomédicas.

ANO	MATERIAL	APLICAÇÃO	TIPO DE LIGA	REFERÊNCIA
1940	Ti cp	Compatibilidade com ossos como implante metálico	α	Bothe (1940)
	Ti dúctil	Lançamento da produção industrial e fundição pelo processo Kroll para aplicações médicas	α	Kroll (1940)
1950	Ti	Compatibilidade do Ti no tecido mole e ossos de coelhos assim como propriedades não citotóxicas do Ti	α	Leventhal (1951)
1957	Ti	Não toxicidade em implantação a longo termo	α	Beder; Stevenson; Jones (1957)
1959	TiNi	Liga com memória de formato	β	Buehler; Gilfrich; Wiley (1963)
1960	Ti	Articulações artificiais	α	Luo; Yang; Tian (2013)
1970	Ti6Al4V	Implantes ortopédicos	β e $\alpha + \beta$	Xue et al. (1970)
1979	Ti6Al2NbTa0,8Mo	Implantes cirúrgicos	$\alpha + \beta$	Whittenberger; Moore (1979)
1970s	Ti6Al2,5Fe	Aparelhos médicos	$\alpha + \beta$	Hanawa (2019)

1985	Ti6Al7Nb	Substituição de articulações	$\alpha + \beta$	Semlitsch; Staub; Weber (1985)
1996	Ti12Mo6Zr2Fe	Implantes cirúrgicos	β	Wang; Gustavson; Dumbleton (1996)
	Ti15Mo2,8Nb0,2Si	Próteses	β	Bhambri; Shetty; Gilbertson (1996)
1997	Ti15Mo5Zr3Al	Molde dental e implantes cirúrgicos	β	Koizumi et al. (2018); Matsuda et al. (1997)
1998	Ti15Sn4Nb2Ta0,2Pd	Implantes médicos	$\alpha + \beta$	Niinomi (1998)
Após 2000	Ti13Zr13Ta	Implantes	β	Aguilar et al. (2019)
	Ti15Mo	Biomédico	β	Im; Lee (2020)
	Ti15Mo2,8Nb0,2Si0,28O	Ortopédico	β	Pellizzari et al. (2020)
	Ti15Zr4Nb4Ta	Implante	β	Okazaki (2001)
	Ti35,3Nb5,1Ta7,1Zr	Biomédico	β	Elias et al. (2006)
	Ti29Nb13Ta4,6Zr	Biomédico	β	Hao et al. (2003)
	Ti15Zr4Nb4Ta0,2Pd	Implantes médicos	$\alpha + \beta$	Xu et al (2008)
	Ti4Al1,5B	Biomédico	-	Yang; Hao; Li (2011)

Fonte: adaptado de (SARRAF et al., 2022).

De maneira geral, segundo Kirmanidou et al. (2016), aponta a necessidade de pesquisas em novas ligas de titânio e tratamentos de superfície para aplicações biomédicas com as seguintes características:

- a) Alta resistência à corrosão, baixo módulo de elasticidade e alta resistência mecânica para evitar falhas mecânicas;
- b) Melhor biocompatibilidade, sem reações alérgicas, citotoxicidade e carcinogenicidade para evitar falhas biológicas;
- c) Mais superfícies bioativas que aceleram e melhoram a osseointegração;
- d) Propriedades antimicrobianas melhores que reduzem as falhas por infecção.

Conforme mencionado anteriormente, em função de suas propriedades, o titânio e suas ligas têm sido amplamente utilizados na produção de implantes dentários, parafusos e grampos ósseos, articulações artificiais, próteses cardiovasculares, entre outras. O problema da osseointegração, termo definido por Brånemark em 1985 como a formação da conexão direta estrutural e funcional entre a superfície do implante e o tecido ósseo vivo, é de extrema importância (LUTJERING; WILLIAMS, 2013). Em um meio complexo e dinâmico, a interface entre o implante e o tecido ósseo é caracterizada pela interação mecânica e biológica do implante com seus tecidos adjacentes e, para a obtenção de estabilidade a longo prazo dessa interface, o principal objetivo é integrar totalmente o implante ao tecido ósseo (GRZESKOWIAK et al., 2020). Com isso, Rasouli, Barhoum e Uludag (2018) afirmam que o fenômeno da osseointegração gera um funcionamento adequado dos implantes e depende dos

seguintes parâmetros: tipo de biomaterial, modelo do implante, tratamento de superfície, técnica cirúrgica, tipo de osso e cuidado do paciente.

Dessa forma, muitos eventos devem ser analisados para aumentar e acelerar a osseointegração nos implantes dentários e ortopédicos. Sendo que este objetivo pode ser alcançado por meio do controle da energia de superfície, da molhabilidade, das cargas eletrostáticas e da rugosidade da superfície; pelo controle do comportamento da célula (adesão, proliferação e diferenciação) e por meio da diminuição da colonização de bactérias (BOYAN et al., 2001; NAVARRO et al., 2008; QIU et al., 1998; WEBB et al., 2000). Por isso, há muito esforço em pesquisas na otimização da superfície de biomateriais, no qual pode-se modificar sua química, estrutura cristalina, morfologia e propriedades. Um exemplo é o efeito da topografia da superfície do biomaterial no comportamento celular, em que estudos afirmam que as células osteoblásticas aderem nas superfícies rugosas mais rapidamente quando comparadas às superfícies lisas (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018). As células ósseas, em particular, têm extrema afinidade com o titânio e tendem a crescer em regiões porosas deste material – ou ao menos aderir bem a ele e proliferar efetivamente nele. Isto é relevante para a produção de forte ligação entre os implantes de ligas de Ti e o tecido ósseo que os cercam (CLYNE; TROUGHTON, 2019).

Embora o titânio não seja tóxico, ainda é um corpo estranho ao tecido ósseo. Mesmo que ele não cause danos ou sofra consequências pelo tecido vivo, sua integração e ligação é pobre e, às vezes, nem existe. Deve-se considerar que a morfologia da superfície, composição, hidrofiliabilidade e a dureza são fatores chave para a interação entre o tecido ósseo e o implante e a osseointegração (DAVIS et al., 2022; LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014; NAJI CHABUK; SALMAN AL-MURSHDY; DAWOOD, 2021; WANG et al., 2015). Com isso, com a finalidade de melhorar a osseointegração do Ti e suas ligas, são produzidos revestimentos na superfície do titânio, por exemplo contendo fosfato de cálcio pois são similares às características do tecido ósseo. Diversas metodologias para modificar a superfície do Ti e suas ligas são utilizadas, tais como tratamento alcalino, oxidação anódica, oxidação por micro arco, ataque ácido, entre outras (DAVIS et al., 2022; LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014; NAJI CHABUK; SALMAN AL-MURSHDY; DAWOOD, 2021; WANG et al., 2015).

Em relação à modificação da superfície do titânio e suas ligas com o propósito de melhorar as suas propriedades, Wang et al. (2015) estudaram sobre sintetizar camadas de óxido em substrato de Ti cp, por meio da PEO em eletrólitos simples, como NaOH e Na₂SiO₃

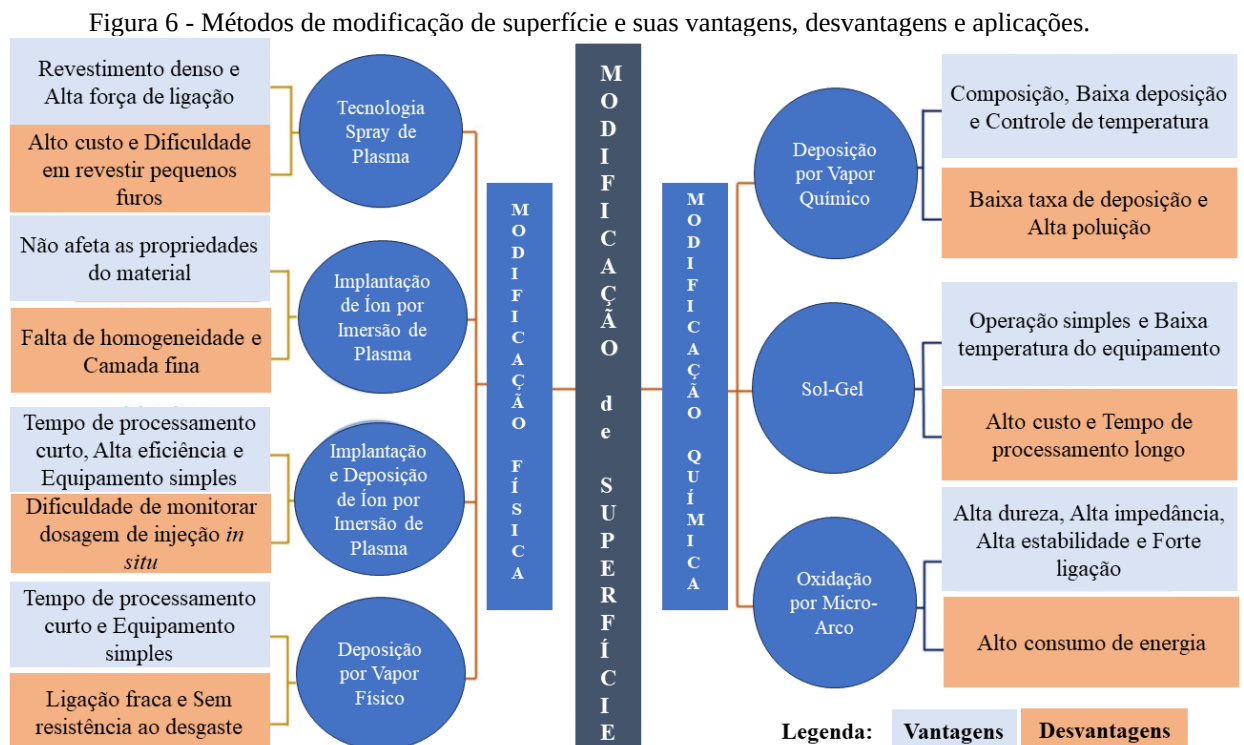
em diversas concentrações. Eles reportaram que houve um aumento na biocompatibilidade do material e que a PEO produziu filmes finos com estrutura porosa em escala micrométrica. Outros pesquisadores focaram na incorporação de óxidos de ferro no eletrólito da PEO, de maneira a aumentar a atividade biológica ou as propriedades bactericidas dos implantes, ao controlar a liberação de íons específicos. Ainda, Thukkaram et al. (2020), estudaram a deposição de TiO_2 enriquecido com Ca, P e Ag por meio da PEO e comprovaram que a superfície porosa gerada aumentou a molhabilidade, dureza, microdureza e a osteocompatibilidade dos implantes de Ti, além de apresentar excelente performance bactericida. Assim, óxidos inorgânicos têm sido considerados promissores para melhorar o efeito positivo de revestimentos na osseointegração e na regeneração óssea. Devido à estrutura da apatita ser tolerante às substituições ou adições iônicas, autores têm a hipótese de que esses elementos possam tornar a apatita mais biocompatível e com composição mais similar à do osso humano para aplicações clínicas (WANG et al., 2015).

Nos últimos anos, a PEO foi empregada para modificar a superfície das ligas $\text{Ti}_{15}\text{Zr}_{10}\text{Mo}$ e $\text{Ti}_{15}\text{Zr}_{15}\text{MoAg}$ (CORREA et al., 2018; TORRENTO et al., 2020). Tais estudos utilizaram esta técnica para obter superfícies bioativas nas ligas desenvolvidas para serem aplicadas como implantes e terem osseointegração. Correa et al. (2018) encontraram em seu trabalho poros provenientes dos filmes da PEO, além de baixa cristalinidade composta por camada amorfa e uma região nanocristalina intermediária de fase anatase e rutilo. Imersão em solução de Hank por 7 dias apresentou melhorias notáveis nas amostras tratadas pela PEO em relação à resposta bioativa e os testes biológicos demonstraram que as ligas Ti-15Zr-xMo e as superfícies tratadas são biocompatíveis. Torrento et al. (2020) concluíram que o tratamento de PEO também produziu uma camada porosa de óxido e fase β . Estes resultados sugerem que o efeito combinado das superfícies com texturas e o enriquecimento da superfície com Ca e P é promissor para promover a formação óssea.

Com isso, muitos estudos se concentraram na modificação da superfície de um implante metálico, alterando sua topografia, morfologia e composição química, com o objetivo de aprimorar funcionalizando a superfície de titânio, aumentando as taxas de sucesso clínico e diminuindo o período de cicatrização.

2.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE BIOMATERIAIS METÁLICOS

Como discutido nas seções anteriores, o titânio e suas ligas têm sido utilizados como biomateriais devido às suas propriedades adequadas para esta aplicação. Entretanto, existem problemas destes materiais que não o permitem serem utilizados na sua forma mais básica, pois o contraste entre a composição do Ti e de suas ligas e o osso humano leva à fraca ligação química entre eles e pouca osseointegração (WANG et al., 2022). Além disso, mesmo que forme uma camada passiva de óxido como proteção da superfície do material devido a reações químicas específicas, a baixa resistência à adesão pode resultar em descolamento desta camada quando exposta aos fluidos corpóreos ou às cargas substanciais. Portanto, a superfície do implante pode liberar elementos tóxicos e causar inflamação. Neste sentido, a modificação de superfície dos biomateriais é uma solução em potencial para garantir que a sua superfície seja protegida contra reações indesejáveis e melhorar as propriedades existentes, ao alterar suas propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas (ZHANG et al., 2020). Assim, pode-se observar na Figura 6 diversos métodos de modificação da superfície dos biomateriais, bem como suas vantagens, desvantagens e aplicações.



Fonte: adaptado de (DAVIS et al., 2022).

Em se tratando mais especificamente do Ti e de suas ligas, a modificação de superfície pode melhorar a estabilidade e a molhabilidade, acelerar a osseointegração e as propriedades bactericidas, estimular cicatrização após uma cirurgia e melhorar a retenção do tecido (DAVIS et al., 2022). Existem diversas técnicas utilizadas para modificar as propriedades de volume ou de superfície de um material que podem criar rugosidade de micro a nanoescala, promovendo integração entre o material e o osso (FAZEL et al., 2021; WANG et al., 2021). Esses métodos podem ser divididos em 3 grupos: técnicas de padronização de superfície, técnicas de funcionalização de superfície e técnicas de revestimento de superfície, que podem ser realizadas por diversas técnicas físicas e químicas. As técnicas físicas incluem a compactação de nanopartículas, montagem de monocamadas, deposição assistida por feixe de íons, deposição por pulverização de plasma, prensagem isostática, entre outras. Por outro lado, as técnicas químicas envolvem ataque ácido, tratamento alcalino, deposição eletroquímica, anodização, oxidação por micro arco, entre outras (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018).

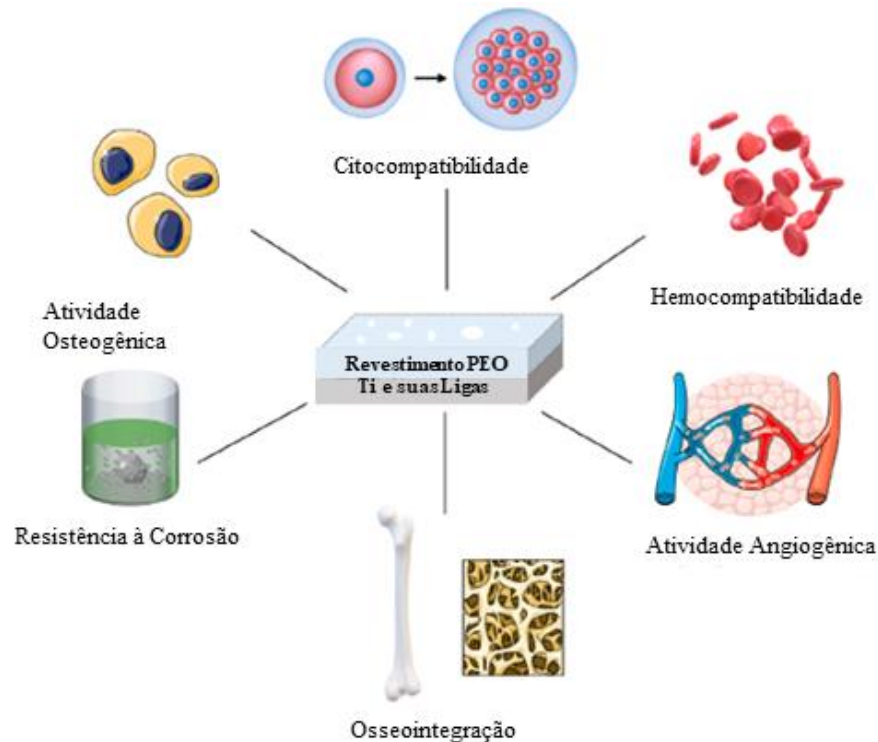
Dentre esses métodos, tais como a eletrodeposição, spray térmico, plasma spray, implantação por imersão de plasma, deposição química e física por vapor, demais revestimentos podem ser utilizados em materiais para formar camadas na superfície que sejam resistentes à corrosão e ao desgaste (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2018). Entretanto, o alto custo, a longa duração do processo deles e a adesão fraca do revestimento no substrato na maioria dos métodos de modificação são indesejáveis (SHOKOUHFAR; ALLAHKARAM, 2016). Portanto, recentemente, o método de oxidação por plasma eletrolítico (PEO), também chamado de oxidação por microarco (MAO), tem sido de grande interesse entre os pesquisadores devido às suas características significativas, como produzir camadas de óxido espessas, aderentes e resistentes na superfície de metais, como Al, Ta, Mg, Zr e Ti e suas ligas (CLYNE; TROUGHTON, 2019; NAJI CHABUK; SALMAN AL-MURSHDY; DAWOOD, 2021; RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018; SHOKOUHFAR; ALLAHKARAM, 2016; WANG et al., 2015). Durante o processo da PEO, cada descarga de plasma é realizada a altas temperaturas e pressão, que se desenvolvem nos canais de descarga e causam processos de transformação de fase complexos, resultando na produção de uma camada porosa e densa, que geralmente é atrativa para resistência à abrasão e à corrosão (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014).

2.3.1 Oxidação por plasma eletrolítico (*plasma electrolytic oxidation* - PEO)

O processo PEO é uma tecnologia utilizada há mais de 30 anos e tem uso comercial significativo durante a maior parte desse tempo. A oxidação por plasma eletrolítico tem uma série de características que a tornam única, como ser uma técnica que envolve uma reestruturação contínua do revestimento em toda a sua espessura, tendendo a reduzir níveis de estresse e a melhorar a sua homogeneidade. Além disso, como os revestimentos são criados por meio do consumo parcial do substrato, eles apresentam excelente adesão interfacial. Por outro lado, os revestimentos resultantes não estão livres daquilo que pode ser considerado como defeitos - porosidade, microfissuras, inclusões, etc. Estes surgem da natureza inerente do processo, que envolve a formação repetida de descargas de plasma, com novo material sendo criado e eles entram em colapso. Esses eventos são altamente transitórios e criam resfriamento rápido e altos gradientes térmicos, por isso a microestrutura do revestimento é desordenada e metaestável. No entanto, os efeitos dessas características microestruturais são amplamente benéficos (CLYNE; TROUGHTON, 2019; ZHANG et al., 2022).

A PEO é um procedimento que tem origem na anodização convencional, de maneira a produzir revestimentos cerâmicos em metais válvula e suas ligas por meio de oxidação anódica assistida por plasma de alta tensão (NARAYANAN; PARK; LEE, 2014). Os metais válvula são metais que podem produzir filmes de óxido anódico, aderentes e eletricamente isolantes, após a anodização. Alguns exemplos de metais válvula são alumínio, tântalo, nióbio, titânio, zircônio e magnésio (KINARD; MELODY; LESSNER, 1998). Os principais benefícios dos revestimentos PEO são: aumentar a resistência à corrosão e o comportamento ao desgaste, juntamente com outras propriedades, incluindo reforçar a capacidade de biodegradação, biocompatibilidade, propriedades dielétricas e estabilidade térmica (ARRABAL et al., 2009; WANG et al., 2022; YEROKHIN et al., 1999). Pode-se observar na Figura 7 a biocompatibilidade de um revestimento da PEO e seus benefícios.

Figura 7 - A biocompatibilidade do revestimento produzido pela oxidação por plasma eletrolítico e seus benefícios.



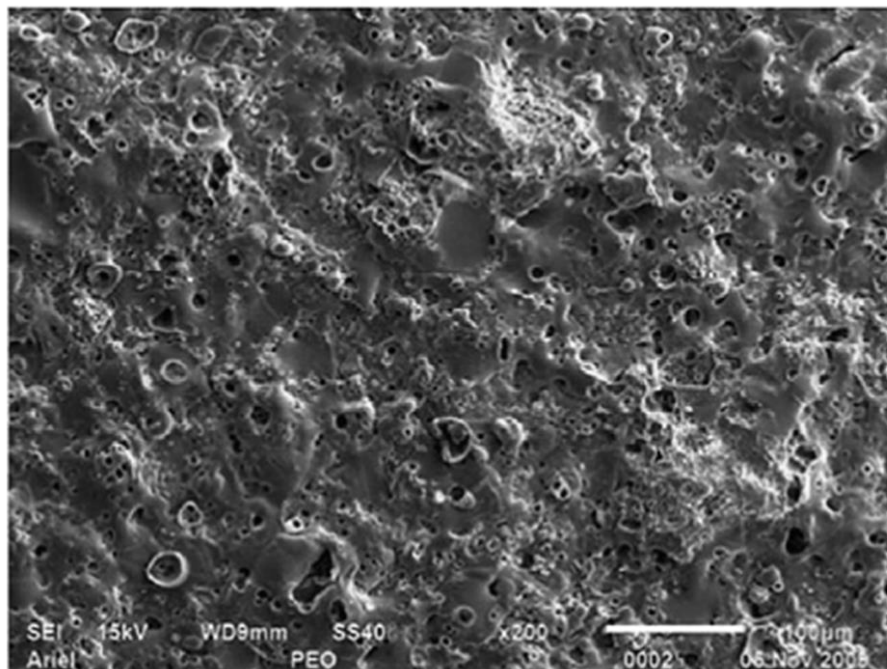
Fonte: adaptado de (WEN et al., 2023).

Assim, considera-se que o processo PEO é mais complexo do que a anodização e todos os outros processos de revestimento (MASHTALYAR et al., 2018). Apesar da preparação e do procedimento parecerem similares à anodização e ambos produzirem uma camada de óxido na superfície do metal, a oxidação não ocorre mais via transporte contínuo de íons ao longo do eletrólito e pela fina camada de óxido, mas pela combinação de átomos ou íons metálicos e oxigênio durante a descarga de plasma ao longo do resfriamento, no qual o metal entra no arco inicialmente pela evaporação do substrato (CLYNE; TROUGHTON, 2019; LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014). Uma das razões para a sua complexidade é que a PEO é totalmente reconstruída ao longo de sua espessura por meio da descarga elétrica que ocorre à medida que a camada cresce. Outra razão é que há um escopo considerável para controlar as situações elétricas e químicas para modificar a microestrutura da camada formada (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2021).

De maneira geral, comparando-se a oxidação por plasma eletrolítico e a anodização, pode-se observar mais algumas diferenças além das mencionadas no parágrafo anterior. Enquanto a anodização é realizada normalmente com baixa tensão, de 5 a 50 V, e corrente constante, a PEO utiliza tensões significativamente maiores, de 100 a 600 V, e geralmente corrente variável. Além disso, o processo da PEO ocorre com faíscas intensas, provenientes

das descargas do micro arco e são elas que resultam a camada de óxido. Por outro lado, o processo de anodização é puramente eletroquímico. Ademais, a camada de óxido produzida pela oxidação anódica pode atingir espessura de aproximadamente 20 a 50 μm , ao passo que a espessura gerada pela PEO é limitada apenas pela fonte de alimentação, chegando a 100-200 μm . Outra diferença é que a anodização produz uma camada relativamente homogênea com poros distribuídos mais ou menos igualmente e a PEO resulta em uma camada de óxido com característica da superfície da lua, no qual poros maiores são distribuídos aleatoriamente, de acordo com Figura 8 (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014; RUDNEV, 2013).

Figura 8 - Exemplo da morfologia de uma camada de óxido formada pela oxidação por plasma eletrolítico.



Fonte: adaptado de (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014).

De maneira geral, a porosidade confere uma baixa rigidez e, portanto, uma alta tolerância à deformação, que, em combinação com boa adesão interfacial, leva à excelente resistência. Além disso, embora tendam a ser porosos e compatíveis, os revestimentos PEO geralmente têm uma alta dureza e apresentam boa resistência ao desgaste (CLYNE; TROUGHTON, 2019).

Na maioria dos casos, as descargas e faíscas elétricas desenvolvidas em um eletrólito resultam na formação de partículas de tamanho micro ou nano. Essas formações de diferentes tipos estão sempre presentes na superfície dos revestimentos óxidos formados sob o efeito da PEO ou MAO e podem ser extremamente ativas tanto física quanto quimicamente, por isso determinam as propriedades do sistema envolvido (SONG; RYU; HONG, 2009). Com isso, pode-se afirmar que este método tem sido aplicado para a formação de revestimentos de

óxidos de diversos componentes, com objetivos funcionais distintos na superfície de metais e suas ligas. Um exemplo de camada é com fosfato de cálcio em superfícies de Ti para aplicações biomédicas (TERLEEVA et al., 2010).

Estudos com a liga Ti6Al4V estão sendo desenvolvidos modificando a superfície das amostras com a técnica PEO e comprovaram que o tratamento pode promover o crescimento ósseo na implantação em coelhos machos adultos saudáveis, com osteogênese precoce ocorrendo primeiramente na superfície do implante, seguida por expansão externa. Eles concluíram que os micros poros das amostras após PEO apresentaram mais tecido ósseo acompanhado de matriz óssea fina e contínua, quando comparado à liga sem tratamento (XIU et al., 2016). Experimentos similares mostraram que após 8 semanas da implantação dos implantes de Ti em coelhos adultos, a superfície com titânio puro ainda estava coberta por tecido fibroso, enquanto nos implantes com revestimento da PEO foi formado osso na superfície (ZHAO et al., 2020). Demais pesquisas apresentaram implantes com modificação de superfície por PEO com melhor contato osso-implante e área de cobertura aderida ao implante (CHEN et al., 2021; DING et al., 2022; NI et al., 2022; WEN et al., 2023).

Além disso, ao otimizar os parâmetros do processo da PEO, a maioria das propriedades de revestimento podem ser controladas (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2021). Com isso, é um método emergente para desenvolver revestimentos totalmente cristalinos, aderentes, porosos, espessos e resistentes (KLAPKIV; POVSTYANA; NYKYFORCHYN, 2006). A superfície porosa da PEO acelera a fixação do osso e aumenta a força de ligação interfacial entre o osso e o implante (AKTUĞ et al., 2017; AKTUG; KUTBAY; USTA, 2017). Ademais, a espessura e a morfologia das camadas de óxido produzidas pela PEO podem ser amplamente controladas ao alterar tanto os fatores intrínsecos (concentração do eletrólito e substrato) (ATAPOUR; BLAWERT; ZHELUDKEVICH, 2019; BORDBAR-KHIABANI; YARMAND; MOZAFARI, 2019; FATTAH-ALHOSSEINI *; MOLAEI; BABAEI, 2020; FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2018; FATTAH-ALHOSSEINI; MOLAEI; BABAEI, 2020; MOLAEI; FATTAH-ALHOSSEINI; GASHTI, 2018; TOORANI; ALIOFKHAZRAEI, 2019; WU et al., 2020), quanto os fatores extrínsecos (temperatura do eletrólito, parâmetros elétricos, aditivos e tempo de tratamento) (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2021).

Entre os parâmetros mais significativos, a concentração e a composição do eletrólito são de extrema importância para produzir revestimentos com diferentes morfologias, composição de fase e propriedades eletroquímicas desejáveis (MOLAEI; FATTAH-

ALHOSSEINI; KESHAVARZ, 2019; RAMA KRISHNA; POSHAL; SUNDARARAJAN, 2010; ROGOV; SLONOVA; MIRONOV, 2013; WANG et al., 2020). Além disso, esses fatores influenciam na porosidade, espessura, resistência à corrosão e biocompatibilidade dos revestimentos produzidos pela PEO. Consequentemente, são relevantes para que a passivação do metal seja rápida e a tensão das faíscas seja facilmente alcançada (WANG et al., 2015).

De maneira geral, eletrólitos fracos alcalinos e ecologicamente corretos, contendo silicatos, fosfatos e ânions são utilizados nos processos da PEO. As principais fontes de fosfato nos eletrólitos são glicerofosfatos de cálcio ou sódio, que têm boa solubilidade em água. Por outro lado, a fonte de cálcio pode ser de algum sal ou pelo mesmo glicerofosfato. E pode-se realizar dopagem de elementos funcionais: Sr, Si, Sn, Mg e Zn, por exemplo. Dependendo da composição do óxido desejada, a PEO pode ser realizada em qualquer eletrólito aquoso, que tem pelo menos 3 papéis no processo: garantir condutividade elétrica alta, dissolver parcialmente o metal oxidado ou a reação química dele e fornecer componentes para formar a camada de óxido (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014).

De acordo com Fattah-Alhosseini et al. (2018), propriedades do revestimento cerâmico produzido na superfície do substrato de Ti puro, usando eletrólitos contendo fosfato, silicato e bases de boro, foram estudados e discutidos. A partir de seus resultados, pode-se concluir que ao variar a composição do eletrólito, quando os demais parâmetros permaneceram constantes, devido à diferença de tensão das faíscas, levou a diferentes morfologias da superfície. Em seus estudos, os autores produziram revestimento com o eletrólito baseado no fosfato porque apresentou maior tensão, superfície com microporos e melhor proteção à corrosão quando comparada com os eletrólitos de silicato. Durante a verificação da influência do eletrólito na estrutura dos revestimentos da PEO na liga de Ti_2AlNb , os eletrólitos com base de silicatos resultaram na formação de uma camada sem aderência, com grande espessura e alta rigidez da superfície. Ainda, os autores mencionaram que os estudos com eletrólitos de aluminatos e fosfatos apresentaram revestimento compacto, mas a camada formada do fosfato era relativamente mais espessa. A química do eletrólito afeta consideravelmente a aceleração da passivação do metal e a ruptura dielétrica, resultando na formação de um filme fino isolante (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2018).

Em relação ao pH do eletrólito, em estudos recentes ainda não está totalmente claro do porquê é um parâmetro essencial para a PEO, principalmente porque a oxidação geralmente é realizada em eletrólitos ácidos (MATYKINA et al., 2009). É importante salientar que o mecanismo de transporte ocorre do oxigênio para o metal e envolve o movimento de íons OH^-

por meio do eletrólito, sob a influência do campo elétrico. Durante a oxidação anódica, entretanto, há fluxo contínuo de íons ao longo do eletrólito estável, enquanto na PEO, o processo é muito mais dinâmico e transitório (CLYNE; TROUGHTON, 2019). Alguns estudos relataram que, devido à estequiometria, o eletrólito utilizado deve ter pH suficientemente alto. De fato, há pesquisas que realizaram a PEO com pH básico, entre 8 e 11 (HAN et al., 2010). Porém, outros produziram HA com sucesso em eletrólitos neutros (7) ou ácidos (6) (CHUNG et al., 2013). A condutividade do eletrólito também é significativa, visto que afeta a corrente elétrica e as quedas de tensão nas colunas do eletrólito nos poros do revestimento e, portanto, podem influenciar na ignição das descargas do plasma (SIMCHEN; SIEBER; LAMPKE, 2017; VENKATESWARLU et al., 2013).

Durante o processo da PEO, a performance do revestimento é influenciada também pelo modo de energia padrão utilizado, no qual diferentes modos de corrente podem ser empregados, incluindo corrente direta (DC – *direct current*) e corrente alternada (AC – *alternating current*). Geralmente, a corrente pulsada também é amplamente utilizada no tratamento PEO, tanto no modo DC de energia quando no modo AC. Os resultados do DC apresentam crescimento do óxido mais lento e alta porosidade, embora ofereça menor controle quando comparada à AC. Uma maneira de ajustar isso é implementando corrente pulsada, que pode diminuir o consumo de energia elétrica também. Já a energia AC pode mitigar a polarização do eletrodo por interromper o arco elétrico ininterruptamente (MING et al., 2023; TORRES-CERON et al., 2019).

Ainda, a técnica PEO é realizada a tensões maiores do que a tensão de ruptura dielétrica do revestimento no qual a ruptura da camada de óxido ocorre simultaneamente à tensão para alcançar o potencial de ruptura. Consequentemente, são gerados os canais de descarga do plasma sob temperatura ambiente. Então, micro descargas de curta duração com incidência de emissão de luz e gás são produzidas de forma constante em toda a superfície do revestimento durante o crescimento da camada. Estes eventos permitem que a camada de óxido seja formada, por isso a tensão é um dos parâmetros que mais influencia o revestimento produzido pela PEO. Devido a participação dos íons do eletrólito no filme óxido pela difusão e pelos processos de eletroforese durante a oxidação, os revestimentos da PEO contêm principalmente o óxido predominante do substrato metálico e mais componentes complexos do eletrólito (CLYNE; TROUGHTON, 2019; FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2018; KHORASANIAN et al., 2011; RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018; WANG et al., 2015).

Outro parâmetro importante para os resultados do revestimento produzido pela PEO é o ciclo de trabalho. Este parâmetro é definido como a relação entre o tempo de ativação do processo e o período do processo todo. Então, quanto maior o ciclo de trabalho, mais longo será o tempo de trabalho em um ciclo e maior a energia descarregada em um pulso (DEHNAVI et al., 2013). O aumento do ciclo de trabalho é equivalente à maior quantidade de tempo da corrente pela tensão aplicada durante cada ciclo. E este parâmetro tem um efeito nas características do revestimento produzido pela PEO similar ao da tensão aplicada. Há uma correlação positiva entre o ciclo de trabalho e a energia térmica liberada no processo e a quantidade de óxido gerado (TANG et al., 2010). Da mesma maneira, a menor taxa de ciclo de trabalho variável possui maior e mais suave micro dureza. Entretanto, a influência do ciclo de trabalho é menor quando a PEO ocorre em tensões relativamente baixas (WANG et al., 2015).

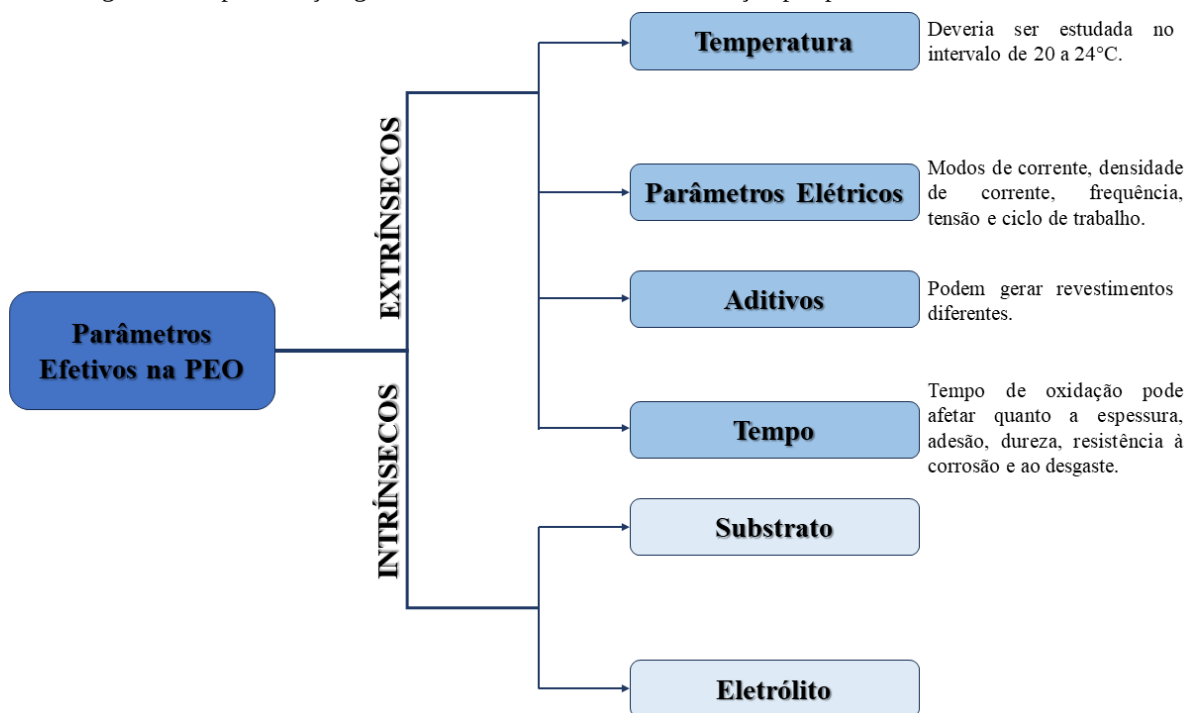
Adicionalmente, o efeito do tempo de duração da oxidação por micro arco é um parâmetro importante que influencia a caracterização dos revestimentos depositados na PEO na superfície do Ti e de suas ligas, segundo Wang et al. (2015). Cheng; Wei; Zhou (2012), estudaram este fator em relação à microestrutura e à distribuição dos elementos por 1, 3, 5, 10, 15 e 30 min, respectivamente. Resultados apresentaram maior diâmetro dos micros poros conforme o tempo aumentava, porém, a quantidade de micros poros na superfície da camada era inversamente proporcional ao tempo de tratamento.

Ademais, a densidade de corrente é outro fator que afeta a microestrutura e as propriedades do revestimento produzido pela PEO. Entretanto, ao aplicar densidade de corrente constante, a intensidade da faísca aumenta e o número de descargas elétricas diminui com o aumento do tempo de processamento. Consequentemente, a camada resultante tem uma microestrutura porosa, de aspecto rugoso e com micros poros grandes. Em contrapartida, se a densidade de corrente decair no último estágio de PEO, reduz a intensidade das descargas elétricas e permite a formação de faíscas menores, distribuídas ao longo de toda a superfície da camada de óxido. Assim, revestimentos obtidos sob essas condições devem permanecer intactos, de aspecto mais liso, com microestrutura homogênea e menos porosa (LIANG; HU; HAO, 2007; PESODE; BARVE, 2021; WANG et al., 2015).

Além disso, devido à alta pressão e temperatura nos canais de descarga, os revestimentos resultantes da PEO podem conter fases que não são formadas na anodização convencional. No método PEO, pode-se obter revestimentos com alta resistência à corrosão e ao desgaste, alta resistência mecânica, forte adesão ao substrato, estrutura cristalina porosa e

alto isolamento elétrico nas ligas de Ti, Al, Mg e Zr (CHAHARMAHALI; FATTAH-ALHOSSEINI; ESFAHANI, 2020; CHENG et al., 2017; FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2018; MOLAEI; BABAEI; FATTAH-ALHOSSEINI, 2021; ROKNIAN et al., 2018; ROKOSZ et al., 2018; STOJADINOVIC et al., 2015; TU et al., 2018). Esta técnica pode ser aplicada a diversos metais e, particularmente, ao Ti e suas ligas devido ao interesse considerável em superfícies de TiO₂ altamente porosas para aplicações biomédicas (CLYNE; TROUGHTON, 2019). Ainda, outras vantagens são a obtenção de revestimentos no formato do material e baixo custo (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2018). Na Figura 9 pode-se observar os fatores que influenciam efetivamente as propriedades da oxidação por plasma eletrolítico (BALA SRINIVASAN et al., 2010; DEHNAVI et al., 2013; FATTAH-ALHOSSEINI; CHAHARMAHALI; BABAEI, 2020; GU et al., 2012; SANKARA NARAYANAN; PARK; LEE, 2014; XIANG et al., 2016).

Figura 9 - Representação gráfica dos fatores efetivos na oxidação por plasma eletrolítico.



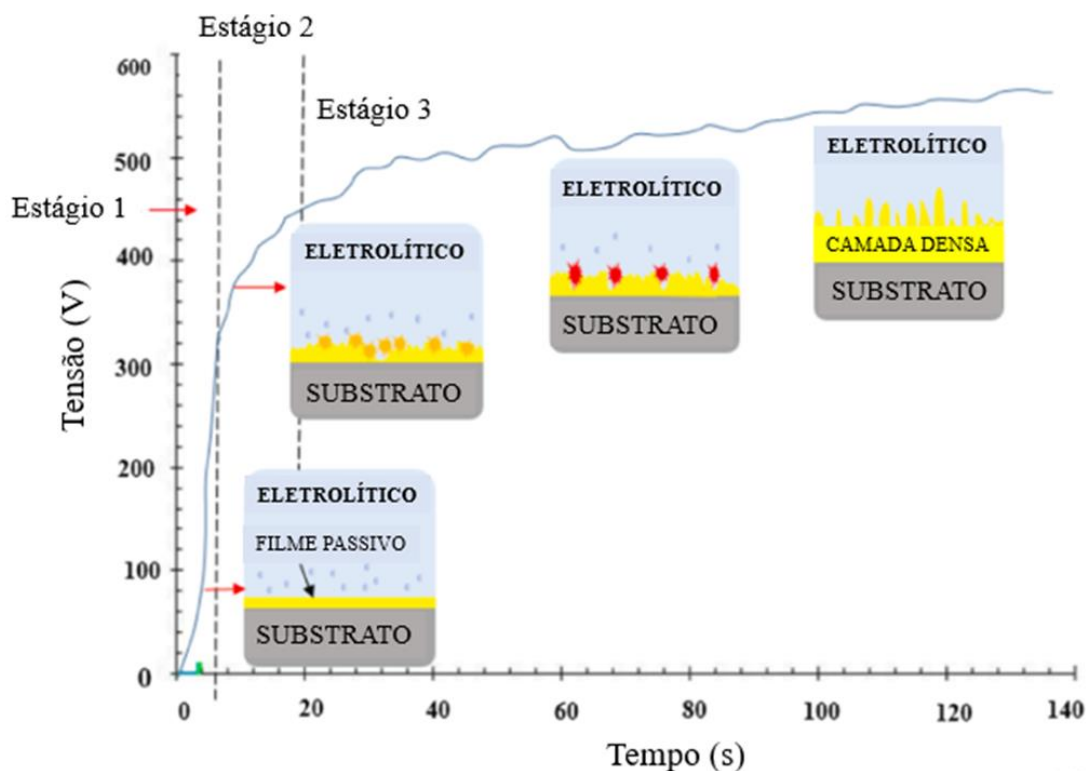
Fonte: adaptado de (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2021).

A metodologia da PEO pode ser descrita como a combinação de oxidação eletroquímica, reação química por plasma e difusão térmica em um eletrólito. A PEO utiliza uma fonte de alimentação para controlar o processo de revestimento e o sistema funciona da seguinte maneira: as laterais da amostra de metal válvula são conectadas a um condutor de cobre por meio de uma pinça e a amostra é tratada como ânodo, por sua vez, o banho eletrolítico de aço inoxidável funciona como cátodo, preenchido com eletrólito que contém

sais dissolvidos. A amostra é imersa na solução do banho eletrolítico (HUSSEIN; NIE; NORTHWOOD, 2013; SARBISHEI; SANI; MOHAMMADI, 2014).

Para facilitar o entendimento do processo da PEO, pode-se observar na Figura 10 o esquema da curva de tensão por tempo durante o processo da PEO sob condições galvanostáticas, no qual tem-se 3 zonas específicas. Conforme o aumento na taxa de tensão, o diagrama divide-se em 3 estágios. No primeiro, a tensão em todas as amostras aumenta linearmente com uma alta inclinação em concentrações distintas. O campo elétrico fornece a força motriz para os ânions e cátions serem transferidos na solução pelo filme de proteção e ajuda a aumentar a espessura deste filme, que exibe a produção de uma camada de óxido na interface entre o metal e o eletrólito. Neste estágio, muitas bolhas pequenas são liberadas e nenhuma faísca é gerada, o que exibe o processo de anodização comum. Conforme a espessura aumenta, a película de proteção funciona como um resistor de corrente. Após, a ruptura dielétrica da camada protetora ocorre em zonas com menor resistência, levando à produção de pequenas faíscas na tensão de ruptura, que caracteriza o início da segunda etapa (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2021; RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018).

Figura 10 - Esquema da relação entre o gráfico de potencial-tempo e o processo de formação do revestimento resultante da PEO.



Fonte: adaptado de (FATTAH-ALHOSSEINI; BABAEI; MOLAEI, 2020).

Na segunda etapa, pode-se observar na superfície faíscas brancas e claras (FATTAH-ALHOSSEINI; BABAEI; MOLAEI, 2020). Neste estágio, as pequenas faíscas brancas e de curta duração, começam a ocorrer na superfície do substrato, no qual há uma intensa liberação de gás nos eletrólitos. De fato, a descarga de faíscas, conhecida como fenômeno de combustão e reação exotérmica contendo agente oxidante, aparece como resultado da absorção adequada de oxigênio por meio dos complexos de oxigênio. As descargas por micro arco levam à erupção de substâncias fundidas dos canais de descarga e, posteriormente, à formação de microporos em forma de cratera no revestimento da superfície (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2018).

No terceiro estágio, as mudanças na tensão estabilizam e as faíscas ficam ligeiramente maiores, no qual a cor altera de branco para laranja. No diagrama de tensão por tempo pode-se observar que a tensão de ignição aumenta à medida que a densidade de corrente aplicada aumenta. Por outro lado, o tempo de passagem da primeira e segunda etapas diminui conforme vai aumentando a densidade de corrente e atinge a terceira etapa, que ocorre mais rapidamente (FATTAH-ALHOSSEINI; BABAEI; MOLAEI, 2020).

Nos processos da PEO, as características das faíscas e o volume do gás emitido influenciam na morfologia da superfície da camada. Faíscas grandes criam maiores e menos microporos, enquanto faíscas menores formam microporos em maior quantidade e mais finos, como resultado formam uma estrutura mais uniforme. Alterações na composição química do eletrólito, sob condições constantes dos demais parâmetros do processo, geram mudanças nas características das faíscas, desde sua tensão, tamanho, intensidade, quantidade até volume da emissão de gás durante o processo PEO (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2018).

Na Figura 11 pode-se observar o mecanismo de formação da camada da PEO. O processo de anodização ocorre em quatro estágios (CLYNE; TROUGHTON, 2019; KRZAKAŁA; KAZEK-KĘSIK; SIMKA, 2013; RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018; SIMCHEN et al., 2020; WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015):

Estágio I: Aumento rápido e linear da tensão de acordo com o tempo da tensão da ruptura. Pequenas bolhas de oxigênio e um filme de óxido podem ser vistos na superfície da amostra, que pode ser associado à anodização tradicional (Figura 11a);

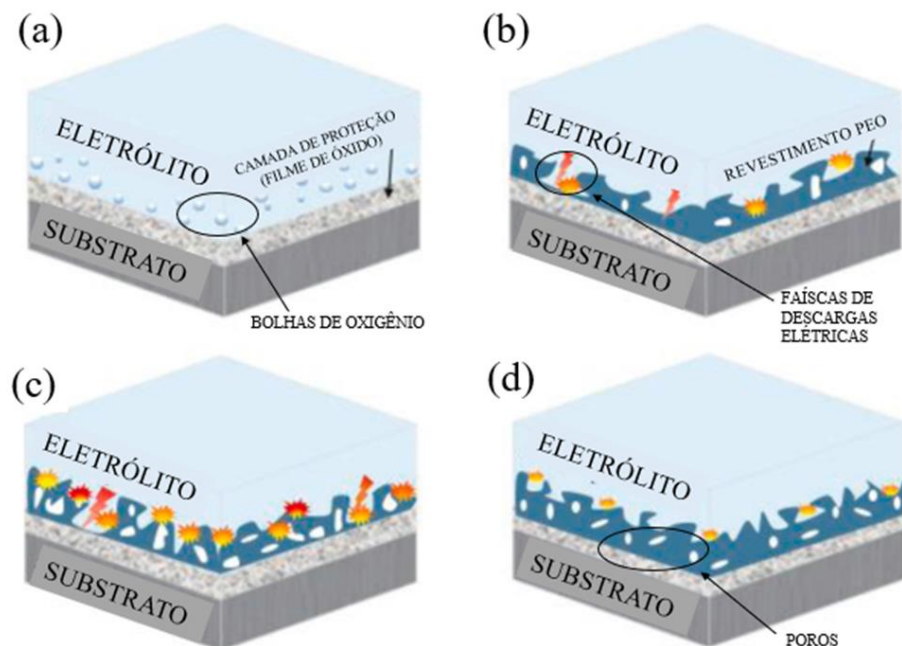
Estágio II: Quando a tensão empregada ultrapassa o valor crítico dado, ocorre a ruptura dielétrica, levando à produção de centelhas de descargas elétricas. Neste estágio, o fluxo de corrente se concentra apenas nas áreas da ruptura, resultando em espessamento localizado da camada de óxido. Esta nova camada pode manter a resistência contra o fluxo de

corrente, enquanto as outras zonas onde a resistência é menor são propensas à ruptura. Nesta etapa, pode-se ouvir um som estridente, pequenas faíscas brancas se espalham acidentalmente e se movem rapidamente por toda a superfície do ânodo (Figura 11b);

Estágio III: A quebra e a formação contínua da camada de óxido fazem com que o potencial celular flutue. A gaseificação da solução e dos metais válvula permite a formação direta do revestimento de óxido cerâmico. A ruptura da camada ocorre em um ponto fraco do filme óxido em crescimento. As faíscas da descarga ficam maiores e sua cor muda de branco para laranja ou vermelho com o aumento do tempo do procedimento. Nesta área, os micros arcos se transformam em arcos fortes (Figura 11c);

Estágio IV: A liberação de gás e as faíscas intensas desencadeiam a produção de grandes poros e fissuras térmicas na camada. A tensão diminui rapidamente, referindo-se ao final do procedimento PEO juntamente com o desaparecimento das bolhas de gás e das faíscas (Figura 11d).

Figura 11 - Representação esquemática da descarga do plasma dentro dos passos distintos do procedimento PEO.

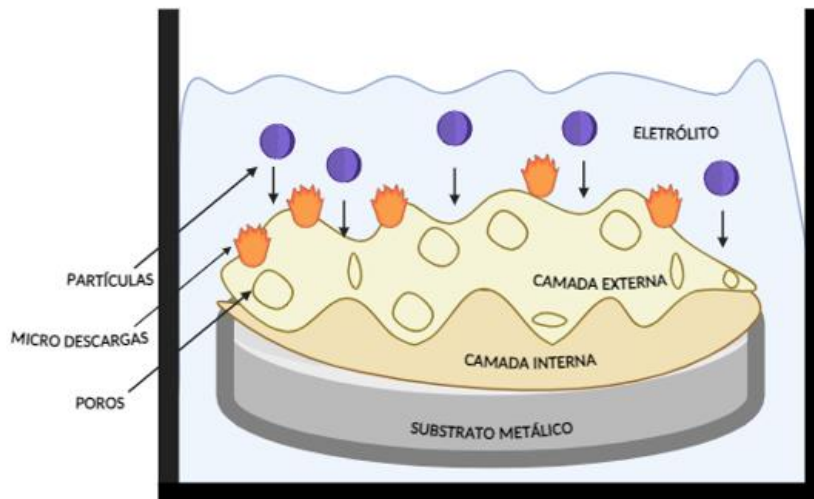


Fonte: adaptado de (FATTAH-ALHOSSEINI; BABAEI; MOLAEI, 2020; RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018).

Após estudos dos estágios da oxidação por plasma eletrolítico, entende-se que a maior quantidade do novo óxido gerado durante cada descarga é formada dentro do plasma conforme ele esfria e colapsa. Então, condensa como líquido e é injetado nas cavidades circundantes sob elevada pressão local, com alguns chegando à superfície livre, no qual tende a entrar em erupção em crateras vulcânicas (CURRAN; CLYNE, 2005). Por fim, a

solidificação finalmente ocorre. Com isso, observa-se que a oxidação se dá antes que a estrutura do revestimento se estabeleça, durante o ciclo das descargas individuais (CLYNE; TROUGHTON, 2019). A partir da Figura 12 pode-se observar o esquema no detalhe da adição de partículas à camada de óxido produzida pela oxidação por micro arco.

Figura 12 - Ilustração esquemática indicando a adição de partículas ao filme de óxido do revestimento produzido pela oxidação por plasma eletrolítico.



Fonte: adaptado de (FATTAH-ALHOSSEINI; MOLAEI; BABAEI, 2020). Criado em BioRender.

2.4 CERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO (CaP)

Fosfato de cálcio (CaP) é um nome comum de uma família de minerais contendo cátions de cálcio (Ca^{2+}) e ortofosfato (PO_4^{3-}), metafosfato (PO_3^-) ou pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), ânions e, às vezes, íons hidrogênio (H^+) ou hidróxido (OH^-) (ELIAZ; METOKI, 2017). Cerâmicas de fosfato de cálcio (CaP) são consideradas bioativas e osseocondutivas. A reação de troca iônica entre o implante bioativo e os fluidos corporais que o cercam formam uma camada de hidroxiapatita que é biologicamente ativa e similar à fase mineral do osso (DAVIES, 2003). As semelhanças entre a fase óssea mineral e suas características estruturais e de superfície são responsáveis pelas suas boas propriedades bioativas, permitindo a ligação no osso sem a mediação de uma interface de tecido fibroso conectando (SCHEPERS et al., 1991).

O osso é uma matriz mineralizada composta por biopolímeros e biominerais, que é a unidade básica do esquema esquelético humano (BOSKEY et al., 2000). A densidade óssea aumenta gradualmente da parte interna para a externa, revelando estrutura porosa (CHEN et al., 2020). Ele é formado por uma série de eventos rigorosamente orquestrados por diferentes

tipos de células ósseas interagindo entre elas e com a matriz extracelular. Estas células incluem osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células de revestimento ósseo. Os osteoblastos são responsáveis pela produção e mineralização da matriz óssea, já os osteoclastos mantêm esta matriz, enquanto os osteócitos se relacionam com a reabsorção óssea (WOZNEY, 1992).

Durante a formação do osso, as atividades mais importantes que ocorrem são a proliferação e diferenciação celular. Para elas ocorrerem, a osteoindução, osteocondução e osseointegração estão relacionadas ao processo de regeneração óssea que ocorre após ferimento ou danos (WANG et al., 2022). A osteoindução refere-se ao estímulo de células para se diferenciarem e desenvolverem um novo tecido ósseo ao redor do implante, promovendo a cicatrização do tecido ósseo (GRZESKOWIAK et al., 2020). Enquanto a osteocondução é o crescimento do tecido ósseo na superfície ou dentro dos poros, canais e tubos do implante. Ela é afetada pelas condições da regeneração óssea, do biomaterial e suas reações (YAO et al., 2021). Com isso, segundo Legeros (2008), os ossos dão sustentação ao corpo e suportam todo o seu peso, protegem os órgãos vitais e auxiliam nos movimentos mecânicos do organismo humano. Portanto, suas propriedades mais importantes incluem a porosidade interconectada, biodegradabilidade, bioatividade, osteocondutividade e a osteoindutividade. Além delas, a arquitetura e a composição do osso permitem a ligação entre as células, migração celular, proliferação e diferenciação, promovendo a formação óssea, reparo e regeneração (KOOLEN et al., 2020; LV et al., 2021; RANA et al., 2021).

Em relação à aplicação biomédica do fosfato de cálcio, o tratamento cirúrgico dos defeitos ósseos e o revestimento de implantes metálicos estão entre as principais. Por sua vez, implantes metálicos, tais como aqueles necessários na substituição na articulação de quadril e próteses dentárias, precisam ter requisitos de propriedades mecânicas, porém não podem formar ligação estável mecanicamente ao tecido ósseo (CAPUCCINI et al., 2008). Com isso, a alta incidência de falhas em implantes ósseos se dá principalmente à osseointegração incompleta e ao efeito *stress shielding*, devido às diferenças significativas entre as propriedades mecânicas do implante e do tecido ósseo adjacente. Por fim, a fixação do implante ao tecido ósseo pode ser melhorada ao revestir a superfície metálica com uma camada fina de fosfato de cálcio (WEBSTER, 2001). Dessa maneira, a deposição de revestimentos de CaP em metais utilizados em implantes ortopédicos e dentais combina a bioatividade do fosfato de cálcio com a resistência do metal, além de poder apresentar as propriedades conforme Quadro 2 (LEGEROS, 2008).

Quadro 2 - Propriedades do fosfato de cálcio necessárias para aplicações médicas.

Propriedades	Definição/ Função
Bioatividade	A habilidade inerente do material participar em reações biológicas específicas ou gerar um efeito nos tecidos vivos
Biocompatibilidade	A habilidade do material em desempenhar uma resposta apropriada do hospedeiro em aplicação específica
Fixação bioativa	Superfícies reativas que se ligam quimicamente com o osso e minimizam a formação da cápsula fibrosa
Bioestabilidade	A habilidade do material manter suas propriedades <i>in vivo</i>
Cristalinidade	Maior nível de cristalinidade previne rápida reabsorção (dissolução) da biocerâmica nos fluidos corpóreos
Estabilidade interfacial e boa adesão	Previne falhas mecânicas sob condições de carregamento de cargas
Osseointegração	Ancoragem direta de um implante pela formação do tecido ósseo ao redor dele, sem crescimento de tecido fibroso na interface – osso-implante
Osseocondução	Habilidade de prover um <i>scaffold</i> para a formação do novo osso
Osseoindução	Processo no qual a osteogênese é induzida. Este termo significa que células primitivas, não diferenciadas e pluripotentes são estimuladas para se desenvolver dentro da linhagem da formação de célula óssea
Reabsorção	Degradação gradual ao longo do tempo para substituir o biomaterial com o tecido natural do hospedeiro
Habilidades terapêuticas	Modelos para a entrega de medicamentos <i>in situ</i> e fatores de crescimento quando requerido
Molhabilidade	Propriedade que indica a habilidade do material em atrair ou repelir moléculas de água

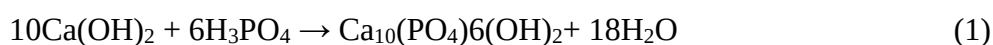
Fonte: adaptado de (ELIAZ; METOKI, 2017).

O osso natural do ser humano é composto por 70% de fase mineral e 30% de fase orgânica. Dentro da porcentagem da fase mineral, a hidroxiapatita abrange 95%. Ela tem fórmula (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e é uma forma de fosfato de cálcio (ALVAREZ; NAKAJIMA, 2009). Segundo Legeros (2008), o termo apatita foi definido em 1786 pelo geologista alemão Abraham Gottlob Werner, baseado na palavra grega antiga “apatao”, que significa “enganar”. A HA tem simetria hexagonal e, dependendo das condições de sua produção, pode formar cristais em formato de agulha ou de placa. Ela pode ser detectada pela relação estequiométrica entre o Ca e o P ($\text{Ca/P} = 1,67$) ou pelo seu padrão característico da difração de raios X (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014; POHRELYUK et al., 2020). As propriedades dos cálcios fosfatos de interesse biológico dependem de sua proporção entre Ca e P, portanto, é crucial calcular a relação atômica Ca/P, sendo que se o resultado der entre 1,5 e 1,667 é um β -tri-cálcio fosfato ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – $\beta\text{-TCP}$) ou uma hidroxiapatita, respectivamente, segundo Tariq et al. (2018).

Conforme estudos *in vitro* de Liu et al. (2008), que variaram a relação Ca/P de 0,5 a 2,5, concluíram que amostras com valor entre 0,5 e 0,75 apresentaram fase tri-cálcio fosfato e $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Em contrapartida, as amostras no intervalo de 1 a 1,33 resultaram em apenas uma fase estável, o tri-cálcio fosfato. Já as amostras com proporção Ca/P iguais a 1,5

demonstraram ter fase tri-cálcio fosfato dominante e início de HA. A partir de resultados com 1,6 Ca/P, a fase hidroxiapatita foi dominante. Por fim, mas não menos importante, nas amostras com valores entre 2,0 e 2,5 apareceram fase CaO na fase de HA, que foi a que prevaleceu. Além disso, a porcentagem de porosidade no substrato contendo cálcio foi inversamente proporcional à proporção Ca/P, portanto, quanto maior o valor Ca/P, menor a porosidade na superfície da amostra.

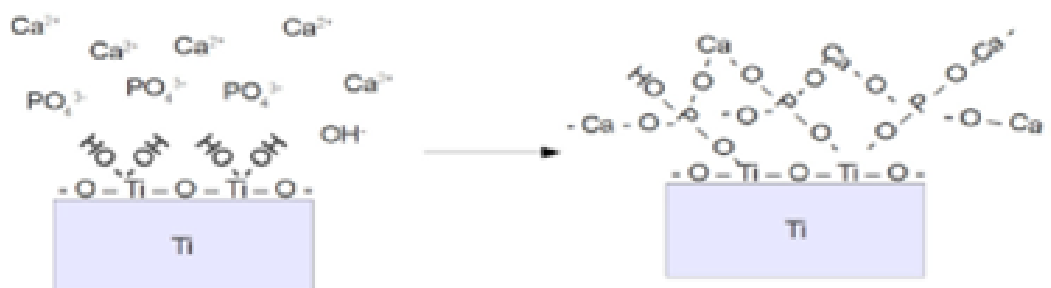
Uma das maneiras de sintetizar a hidroxiapatita é por meio da reação direta de hidróxido de cálcio aquoso com ácido ortofosfórico, à temperatura ambiente, descrita na Equação 1 (OSAKA et al., 1991).



Em relação à aplicação, a hidroxiapatita não tem aplicação convencional de material cerâmico, entretanto, é amplamente utilizada como biomaterial. Esta aplicação se deve à hidroxiapatita ser um constituinte importante de biocimentos especiais para osso e dente (RABIEE; MOZTARZADEH; SOLATI-HASHJIN, 2010). Ela serve como uma fase estacionária na separação cromatográfica de proteínas (DEPPERT; LUKACIN, 1999). Além disso, ela apresenta propriedades catalíticas e pode ser utilizada como uma matriz para catalisadores de titânia (MURAKAMI; KAMITAKAHARA; IOKU, 2009). Por último, mas não menos importante, HA pode ser um intermediário eficiente que promove a osseointegração dos implantes de titânio, segundo Lugovskoy; Lugovskoy (2014).

Ainda sobre a hidroxiapatita, acredita-se que ela se conecta ao titânio devido à camada de titânia ($\text{TiO}(\text{OH})_2$) que está sempre presente na superfície metálica, como pode ser observado no esquema da Figura 13. Apesar das vantagens da HA, uma característica menos atrativa para aplicação biomédica é que várias bactérias, incluindo espécies patológicas, são logo adsorvidas nos seus poros e podem causar infecções bacterianas (KINNARI et al., 2009). Embora há evidência de que a hidroxiapatita tenha atividade bactericida, muitos pesquisadores acreditam que, quando aplicada em implantes dentais e ortopédicos, a hidroxiapatita deve ser enriquecida ou revestida com outro material antibacteriano (MM et al., 2007).

Figura 13 - Esquema da conexão entre a hidroxiapatita e uma superfície de titânio.



Fonte: adaptado de (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014).

Hoje em dia, hidroxiapatita e cerâmicas de fosfato de cálcio são comumente utilizadas para revestimento em implantes de titânio para melhorar a biocompatibilidade, a bioatividade e aumentar a osseointegração (LI et al., 2010). Isso ocorre porque vários estudos mostraram que os íons de cálcio e fosfato são liberados dos revestimentos de CaP e precipitam apatita, além de incorporar moléculas biológicas como fator de crescimento. Esse depósito fornece um substrato para adesão celular, diferenciação nos osteoblastos, síntese do colágeno mineralizado, crescimento do tecido ósseo e melhora na osseointegração (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018).

Para revestir a superfície do titânio e suas ligas, pode-se utilizar diversos métodos, que podem ser hidrotermais, químicos ou eletroquímicos. Segundo Lugovskoy; Lugovskoy (2014), um dos métodos que tem sido utilizados é a oxidação por plasma eletrolítico (PEO), também conhecido como oxidação por micro arco (MAO). Se o eletrólito no qual a PEO é realizada contém íons de cálcio e fosfato, a camada de óxido produzida pode conter hidroxiapatita (HA) (ROKOSZ et al., 2020d). A quantidade de HA pode aumentar caso após a PEO seja realizado um tratamento hidrotermal (LIU et al., 2006). Então, esta hidroxiapatita possui propriedades adequadas para aplicação do material como biomaterial, tais como porosidade, espessura controlada e uma densidade considerável, que favorecem sua utilização em cirurgia dentária e de ossos (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014).

2.5 ESTRÔNCIO

O estrôncio é um oligoelemento encontrado em rochas calcárias e nos oceanos (ROSENTHAL; EVES; COCHRAN, 1970), além disso, é um componente natural em comidas e bebidas (ROSENTHAL; COCHRAN; EVES, 1972). Os oligoelementos, também

denominados microelementos ou elementos traços, são elementos de baixo peso molecular, podendo ser definidos como catalisadores no metabolismo das reações enzimáticas dos seres vivos. Devido à similaridade química e física do estrôncio em relação ao cálcio, inclusive pertencem ao mesmo grupo da tabela periódica, o Sr é um elemento estudado para mimetizar as características do osso humano e cerca de 98% da quantidade total de Sr no organismo humano está localizado no tecido ósseo (DAHL et al., 2001). Ademais, uma quantidade significativa de pesquisas na área indicou o efeito duplo de íons de estrôncio estáveis (Sr^{2+}) para promover a formação óssea e reduzir a reabsorção óssea em diversos estudos experimentais e testes clínicos nos últimos anos (BAIN et al., 2009).

A partir dessas informações, pode-se atestar que o estrôncio é um elemento essencial para o corpo humano, no qual pode promover a proliferação dos osteoblastos, aumentar a atividade fosfato-alcalina e inibir a produção de osteoclastos, além de acelerar a integração biológica entre os implantes e o tecido ósseo hospedeiro (COSTA et al., 2021). Yu; Choe (2019) concluíram que a proliferação celular aumentou proporcionalmente ao aumento na quantidade de estrôncio, ao estudar as mudanças morfológicas e a osteogênese (formação e desenvolvimento do osso) dos revestimentos da PEO em eletrólitos com íons de Ca, P, Sr e Si. Outros autores revelaram que uma alta porcentagem do revestimento PEO dopado com Sr foi mais benéfico para a restauração do implante em pacientes com osteoporose (SHEN et al., 2022). Avci et al. (2017) estudaram previamente que mesmo em baixas concentrações de Sr (3 a 7%) em HA, pode estimular a atividade dos osteoblastos e a diferenciação *in vitro*. Além disso, estudos *in vivo* também apresentaram melhora na densidade óssea e na microarquitetura ao redor dos implantes em animais com osteoporose.

Estudos recentes têm proposto funcionalizar implantes de titânio com estrôncio. Para isso, pesquisadores utilizaram oxidação por micro arco para dopar Sr na superfície de Ti, que melhorou consideravelmente a adesão celular da superfície, além de aumentar o espalhamento e a diferenciação osteogênica *in vitro*, quando comparada ao grupo controle das amostras idênticas quimicamente, exceto pelo Sr. Com isso, o grupo dopado com Sr provou ter melhorado a bioatividade, promovendo a osseointegração (MANDRACCI et al., 2016). Liu et al. (2015) concluiu que a superfície de Ti modificada com Sr aumentou consideravelmente a adesão, a proliferação e o crescimento celular. Entretanto, é difícil controlar a quantidade de estrôncio que é incorporado na camada do tratamento da PEO. Recentemente, pesquisadores descobriram que o tempo de oxidação e a densidade de corrente têm um efeito importante na quantidade de Sr no revestimento (VAN HENGEL et al., 2021). Além disso, o eletrólito é um

dos fatores chave para determinar a quantidade de Sr incorporada na camada, portanto, o efeito da concentração de acetato de estrôncio no eletrólito da PEO e a sua performance no revestimento gerado merecem maior investigação (ZHANG et al., 2022).

O desenvolvimento do elemento estrôncio como biomaterial se iniciou em pesquisas com administração oral do Sr, porém a aplicação sistêmica apresentou reações adversas, tais como alergia na pele, necrose epidérmica, entre outros sintomas. Posteriormente, a tentativa de aplicação local do Sr foi uma tentativa interessante para melhorar a osseointegração do implante e evitar potenciais reações indesejadas. Assim, estudos dos últimos 20 anos, mostraram interesse na preparação e caracterização de hidroxiapatita substituída por Sr (SrHA). Consequentemente, essas SrHAs com diferentes quantidades de Ca^{2+} substituídas por Sr^{2+} demonstraram estimular atividade osteoblástica e inibir proliferação dos osteoclastos. Com isso, modificações na superfície do titânio e suas ligas com revestimento de SrHA têm sido sintetizadas por técnicas, tais como deposição pulsada por laser, método biomimético ou pulverizador de plasma. Resultados desses estudos comprovaram efeitos benéficos nas células osteoblásticas e nenhuma influência negativa nos osteoclastos, além de promover a osseointegração (CAPUCCINI et al., 2008; LI et al., 2010; LIU et al., 2015).

Ademais, pesquisadores têm buscado aproveitar os efeitos estimulantes do Sr na cicatrização óssea incorporando-o em vários biomateriais. Por exemplo, autores doparam o elemento Sr em biocerâmicas para estudar sua ação na regeneração óssea (SABARESWARAN et al., 2013). Outros substituíram o Sr por algum biomaterial com o objetivo de melhorar a situação de ossos com osteoporose e obtiveram melhora significativa na formação óssea (LIN et al., 2013). Mais um exemplo são estudos sobre a incorporação de Sr na superfície do Ti e suas ligas, que reportaram formação óssea melhorada, porque gerou efeitos positivos na química da superfície do material (LI et al., 2014). Ainda, essa opção deve aumentar a osteocondutividade da superfície do implante e do osso, além de aumentar a osseointegração (WEN et al., 2015).

Outras pesquisas estão sendo desenvolvidas sobre o assunto, mais focadas em ensaios *in vitro* e *in vivo*, com objetivo de promover formação óssea e inibir a reabsorção óssea, promover atividade dos osteoblastos e inibir a função dos osteoclastos *in vitro* (LIU et al., 2015). Por exemplo, Li et al. (2010) investigou os efeitos do revestimento de SrHA na fixação do implante em osso com osteoporose. Em seus estudos, relataram que a modificação da superfície melhorou a osseointegração em ratos. Mais um exemplo foi de Lee et al. (2010), que investigaram revestimentos de MAO em eletrólitos com diferentes concentrações de Sr e

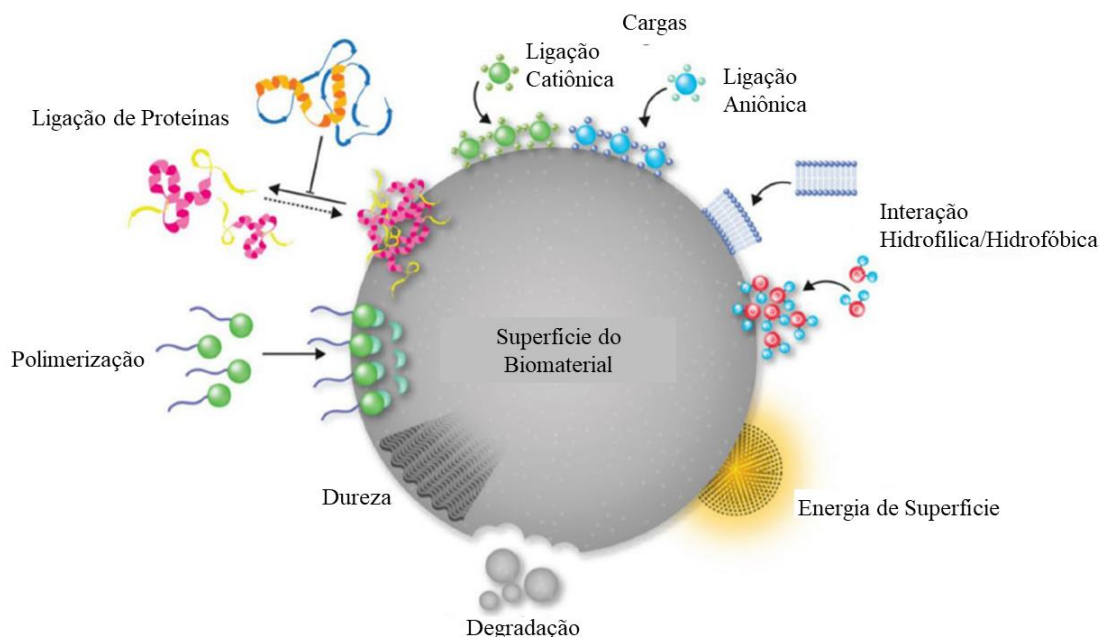
concluíram que em nenhuma condição alterou as características físico-químicas, apesar de ter efeito da resposta celular. Segundo Wang et al. (2015), a proliferação celular nos grupos contendo 1% ou 5% de Sr foi maior quando comparado ao grupo controle (sem Sr) após 14 dias de cultura celular, porém nos grupos com 10% ou mais Sr, não foi benéfico ao crescimento celular.

Outro exemplo de aplicação do Sr foi o trabalho de Capuccini et al. (2008), que sintetizaram filmes finos de hidroxiapatita (HA) com diferentes quantidades de estrôncio substituindo o cálcio (0, 1, 3 ou 7 %p) por meio de deposição pulsada a laser. A partir de seus estudos, atestaram que a camada obtida apresentou boa cristalinidade, no qual diminuía um pouco conforme a quantidade de Sr aumentava e também concluíram em sua revisão da literatura que há um aumento no interesse do Sr como biomateriais para tecidos ósseos, devido ao efeito benéfico deste elemento sobre o osso.

2.6 IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS BIOLÓGICOS DAS AMOSTRAS

Após a implantação de um material sintético no corpo humano, ocorre uma série de interações entre a superfície do implante e o ambiente fisiológico, por isso é evidente que a superfície do implante desempenha um papel fundamental quando os materiais ou dispositivos biomédicos respondem ao meio ao qual foi inserido. O tecido pode apresentar reações desejáveis ou indesejáveis ao implante, dependendo principalmente das características da superfície e do tipo de material. (DAVIS et al., 2022; RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018). Na Figura 14 pode-se observar um esquema das principais propriedades relacionadas à resposta biológica de um biomaterial.

Figura 14 - Ilustração das propriedades físico-químicas de superfície principais em relação à resposta biológica de um biomaterial.



Fonte: adaptado de (DAVIS et al., 2022).

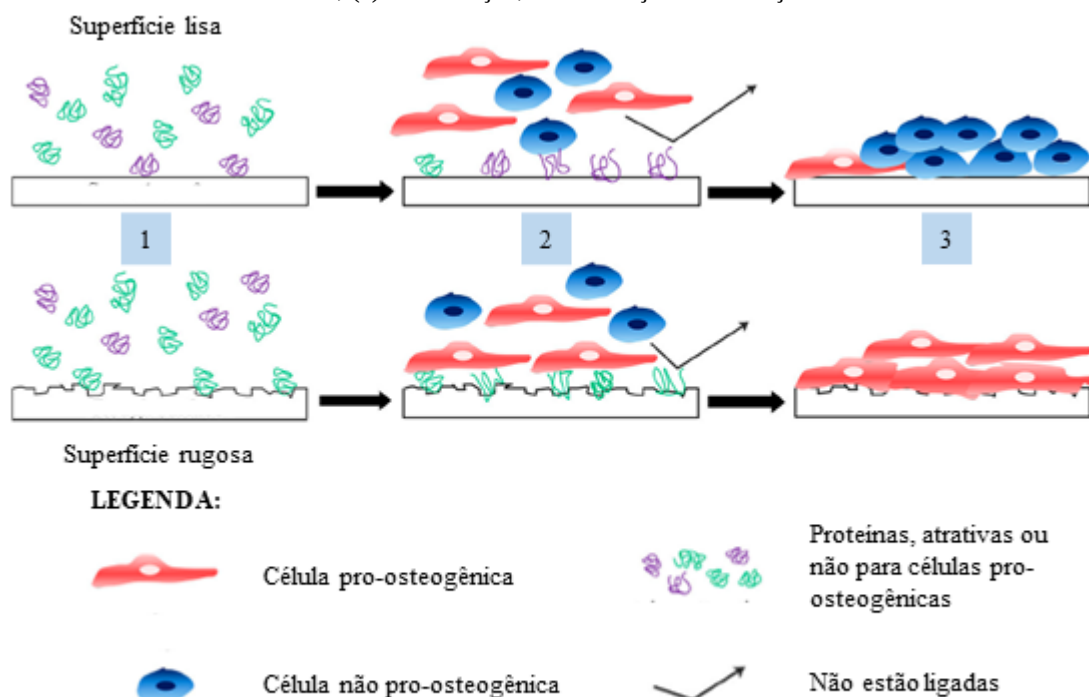
Dessa maneira, algumas das maiores atividades que podem ocorrer na superfície após a implantação de um biomaterial podem ser divididas em interação da água com a superfície, adsorção de proteína, aderência e proliferação celular, conforme estudos de Davis et al. (2022). Na fase inicial, em um tempo de nanossegundos, as moléculas de água reagem com a superfície do biomaterial e pode-se caracterizar esta superfície devido à sua molhabilidade. Uma superfície hidrofílica possui ângulo de contato menor que 90° , ao contrário da superfície hidrofóbica que possui um ângulo de contato maior do que 90° . A primeira tem forte afinidade com as moléculas de água, promovendo seu espalhamento e maximizando seu contato com a superfície. Em contrapartida, a segunda repele as moléculas de água e minimizam seu contato com a superfície, gerando a formação de gotas. O ângulo no qual a interface das moléculas de água encontra a superfície do biomaterial é definido como ângulo de contato (ROACH et al., 2007).

Assim, a molhabilidade da superfície depende de algumas propriedades de superfície, incluindo a carga da superfície, a rugosidade, a porosidade e a composição química. Além disso, a proliferação celular, a bioatividade e o crescimento de superfícies biomiméticas do implante biomédico são afetados pelos valores de molhabilidade (ARONOV et al., 2006). Dessa maneira, um baixo ângulo de contato, ou seja, alta molhabilidade, resulta em alta energia de superfície, apresentando fixação celular superior (HAN et al., 2008).

Adicionalmente, há uma alegação de que a alta molhabilidade possui um indicador positivo com muitas propriedades biológicas, incluindo o crescimento de apatita *in vitro*, bem como a fixação adequada de células e extensão *in vivo* (FIDAN et al., 2017). Consequentemente, pode-se atestar que a molhabilidade é tão significativa em água e absorção de proteína quanto a superfície do implante (PONSONNET et al., 2003). E também pode-se concluir que a adesão celular é positivamente associada com a molhabilidade da superfície do material (HUANG et al., 2011; OCHSENBEIN et al., 2008).

Em relação à rugosidade da superfície do material, segundo Ming et al. (2023), apesar dos fibroblastos aderirem mais facilmente em superfícies lisas, as células ósseas aderem, proliferam e se diferenciam mais prontamente em superfícies rugosas (Figura 15). Superfícies com rugosidade moderada e porosidade geram maior área de ligação e estabelecem conexão mecânica mais forte, promovendo integração implante-osso estável. Além disso, osteoblastos em cultura em superfícies rugosas demonstram aumento na produção de colágeno e maior processo de calcificação.

Figura 15 - Diagrama ilustrando a interação entre as células e o material em superfícies lisas ou rugosas: (a) Estrutura da superfície influenciam na adsorção de proteínas; (b) As proteínas impactam na atração e anexação celular; (c) Proliferação, diferenciação e maturação.



Fonte: adaptado de (MING et al., 2023).

Continuando com as atividades que ocorrem na superfície após a implantação de um biomaterial, a segunda fase compreende na adsorção de diversas proteínas em poucos segundos na superfície com rápida migração de pequenas proteínas, seguidas das maiores, que

formam uma camada de proteína consideravelmente espessa (ROACH et al., 2007). Subsequentemente, a terceira fase consome horas de interação celular ao longo da camada de proteína recém formada e, posteriormente, na topografia da superfície do biomaterial. Neste estágio, a superfície do biomaterial fica exposta à diversas interações moleculares e biofísicas. As seguintes propriedades evoluem, como rigidez, molhabilidade, topografia, entre outras. A proliferação ocorre na quarta e última fase, no qual há o desenvolvimento contínuo dos estágios anteriores e pode durar alguns dias ou até anos (LAURÉN, 2020).

De forma a estudar novos materiais para aplicação biomédica, com foco em otimizar as suas propriedades de superfície, os ensaios *in vitro* desempenham um papel crucial na medição biológica de novos biomateriais. Eles oferecem uma simulação do comportamento dos implantes em meio biológico (WANG et al., 2015). Geralmente, uma superfície de um material adequado para ser utilizado como um biomaterial deve ter propriedades que incluem biocompatibilidade e bioatividade superiores aos demais materiais. Particularmente para usos ortopédicos e odontológicos, a superfície do implante deve ser capaz de acelerar a formação de novo osso e unir-se estável e firmemente ao osso durante todo o tempo de implantação (ZHANG et al., 2012).

Do ponto de vista da biônica, funções celulares podem ser melhoradas positivamente pela construção de uma estrutura hierárquica contendo partes micro e nanométricas em superfícies de um implante para melhor imitar a arquitetura natural da matriz extracelular (LUTOLF; GILBERT; BLAU, 2009). Consequentemente, houveram tentativas de preparar micro e nanotopografias biomiméticas promissoras para aplicações em engenharia de tecidos e implantes, implicando em um enorme potencial na modificação da superfície para implantes ósseos. Alguns estudos também investigaram o efeito osteogênico de implantes de Sr em Ti com morfologia de superfície hierarquicamente complexa (ZHANG et al., 2013).

Assim, no ramo da engenharia química de um implante, criando uma superfície micro ou nanoestruturada e melhor molhabilidade, gera um controle maior da adesão celular, colonização das células e, consequentemente, o monitoramento desses fatores melhora a osseointegração e reduz o tempo de cicatrização (MANTRI; MANTRI, 2013). Um exemplo de modificação de superfície é a deposição de revestimentos de apatita em meios biológicos, que depende de vários aspectos, como morfologia, porosidade, tamanho das lamelas, rugosidade e cristalinidade (DINÇER et al., 2013). No caso de aumentar a cinética de nucleação da apatita na superfície do revestimento em ambientes biológicos está consideravelmente associado às interações observadas na Figura 14.

Com isso, numerosas investigações sugeriram que a estrutura micro ou nanocristalina possui mais locais de nucleação para a produção de apatita devido à alta energia no limite da superfície (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2021). Esse fato é fundamental, porque a produção do filme de apatita semelhante ao osso foi determinada como vital para a forte ligação química entre o osso e o material artificial (KITSUGI et al., 1987). Além disso, durante o desenvolvimento de um novo material artificial ósseo, na etapa inicial da implantação, às vezes, a hidroxiapatita é gradualmente produzida na superfície, mas com o aumento do tempo de revestimento, mais hidroxiapatita é produzida nele, segundo Fattah-Alhosseini et al. (2021).

Em relação à porosidade do material, estudos comprovaram que implantes com superfícies porosas são mais prováveis de se integrarem fortemente ao osso (OSHIDA et al., 2010). Autores também concluíram que a adesão das células depende da porosidade, além de alta molhabilidade, que resulta em alta capacidade das células aderirem (SANDHYARANI; PRASADA RAO; RAMESHBABU, 2014).

Além da importância de monitorar os fatores bioatividade, molhabilidade e porosidade em estudos *in-vitro*, ao modificar a superfície de um material, a colonização de bactérias no corpo humano é um problema considerável para os revestimentos produzidos em implantes ortopédicos e dentários. Esta colonização leva às infecções bacterianas que resultam em complicações destrutivas e podem levar à falha do implante (YOSHINARI et al., 2001). As infecções por bactéria podem ocorrer durante ou após a cirurgia, no qual a bactéria pode estar na região externa do implante (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2020). Essas infecções são uma ameaça global, devido ao seu grande potencial de causar falha múltipla nos órgãos e aumentar o risco de outras doenças (HUANG et al., 2023; JI et al., 2023; LIN et al., 2023; TANG et al., 2021). A remoção dessas infecções é uma tarefa desafiadora, sendo que uma das opções para as evitar é aplicando agentes bactericidas na superfície do implante.

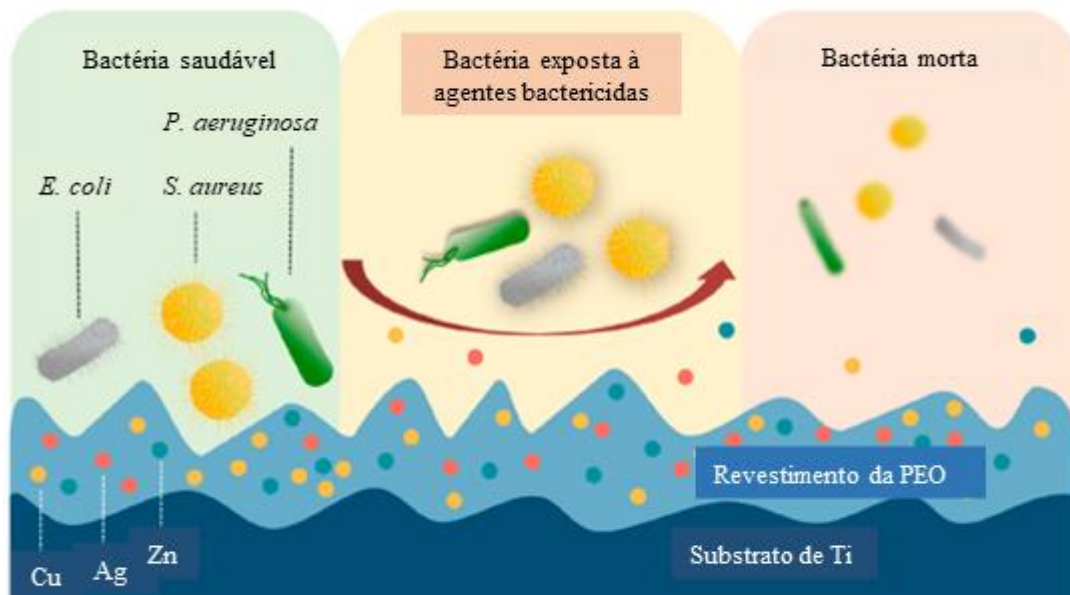
Dessa forma, alguns parâmetros importantes devem ser considerados para a produção de um revestimento bactericida. A princípio, o revestimento não deve limitar a integração do tecido e, preferencialmente, deve até desenvolvê-lo. Em segundo lugar, a camada criada deve ser adaptada ao seu ambiente e às bactérias relacionadas, ou seja, o revestimento antibacteriano deve ser adaptado de acordo com o ecossistema bacteriano (ZHAO et al., 2009). Portanto, uma estratégia interessante é utilizar revestimentos bactericidas que estejam ancorados covalentemente nas moléculas antibacterianas da superfície do implante. Uma vez que a bactéria adere na superfície do implante, ela secreta um polissacarídeo protetor que

forma um biofilme e funciona como uma barreira contra a penetração de antibióticos, levando à falha para erradicar a infecção, a resistência ao antibiótico e infecções crônicas (HEUER et al., 2007; DONLAN, 2001).

Devido à diminuição da eficiência dos antibióticos com cepas resistentes, pode ser necessário introduzir estratégias alternativas e, dado a dificuldade em lidar com a bactéria após a formação do biofilme, um método eficiente para lidar com infecções é prevenir que as superfícies se conectem no início do processo (SMALL, 1975). Logo, micro ou nanoestruturas na superfície podem ser uma estratégia alternativa para prevenir a adesão das bactérias. Portanto, o tamanho e o formato dessas partículas são fatores cruciais para a atividade antimicrobiana (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018).

Apesar da técnica de oxidação por plasma eletrolítico ter bons resultados para aplicações biomédicas, também tem risco de infecção por bactéria. Com isso, pesquisadores tem explorado o uso de elementos metálicos, tais como Cu, Ag, Zn, Mg, Sr, que são agentes antimicrobianos para melhorar as propriedades dos revestimentos da PEO no Ti e suas ligas (Figura 16). Ao incorporar estes elementos na camada formada pela PEO, pode ajudar a reduzir o risco de infecção, tornando estes materiais ainda mais interessantes para aplicações biomédicas (WEN et al., 2023).

Figura 16 - Contato direto com elementos antimicrobianos causa danos físicos e morte celular nas bactérias.

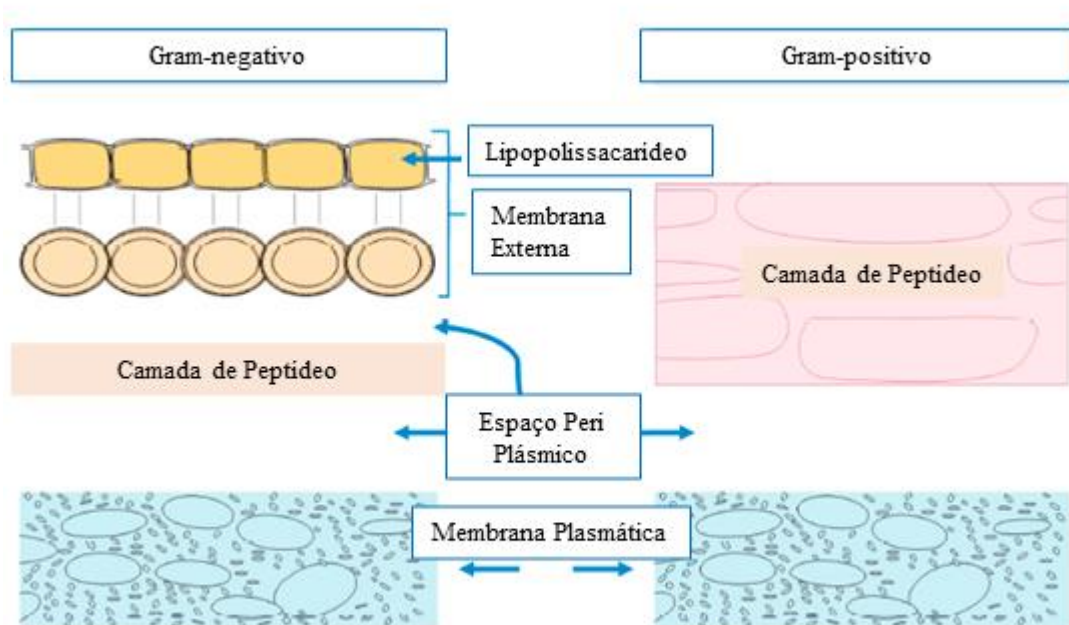


Fonte: adaptado de (WEN et al., 2023).

Geralmente, as propriedades bactericidas dos revestimentos formados pela PEO são discutidas em relação à bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Ela é um patógeno virulento importante, muito comum em infecções em hospitais. É conhecida por ser gram-

positiva e responsável pela contaminação de biomateriais metálicos. Fattah-alhosseini et al. (2020) estima que aproximadamente 34% das infecções em implantes ortopédicos é causada por ela, apesar de ser encontrada naturalmente nos cabelos dos humanos, por exemplo. Ainda, os autores explicam que a maioria das bactérias é classificada em gram-positiva e gram-negativa. A primeira é encapsulada por uma unidade de membrana de lipídeo e contém um filme fino de peptídeos. Em contraste, a segunda é rodeada por membrana citoplasmática e por uma membrana celular externa contendo apenas um filme fino de peptídeo, esta é chamada de periplasma. Pode-se observar na Figura 17 a comparação entre as partes da membrana celular.

Figura 17 - Comparação entre a estrutura celular da bactéria (a) gram-negativa e (b) gram-positiva.



Fonte: adaptado de (FATTAH-ALHOSSEINI et al., 2020).

3 EXPERIMENTO 1

3.1 OBJETIVOS E HIPÓTESES

Avaliar por meio da realização de estudos *in vitro*, a adesão e proliferação celular na superfície da Ti15Zr15Mo (TZM) após tratamento de superfície empregando o método químico PEO (Oxidação por Plasma Eletrolítico) com concentrações distintas de estrôncio.

Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- a) Modificar a superfície da liga Ti15Zr15Mo por oxidação por plasma eletrolítico, de maneira a obter camada porosa;
- b) Verificar qual dos grupos com concentrações diferentes de acetato de estrôncio apresenta resultados mais adequados para aplicação biomédica e escolher o respectivo eletrólito para continuar com os estudos *in vitro*;
- c) Realizar a análise biológica das amostras para verificar a viabilidade na aplicação como biomaterial.

As hipóteses desta pesquisa são:

H1: A liga Ti15Zr15Mo (TZM) sem tratamento de superfície é indicada para aplicações biomédicas, mas apresenta baixa adesão celular;

H2: O tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico (PEO) com fosfato de cálcio (CaP) pode proporcionar maior adesão celular quando comparado à liga Ti15Zr15Mo (TZM) sem modificação da superfície;

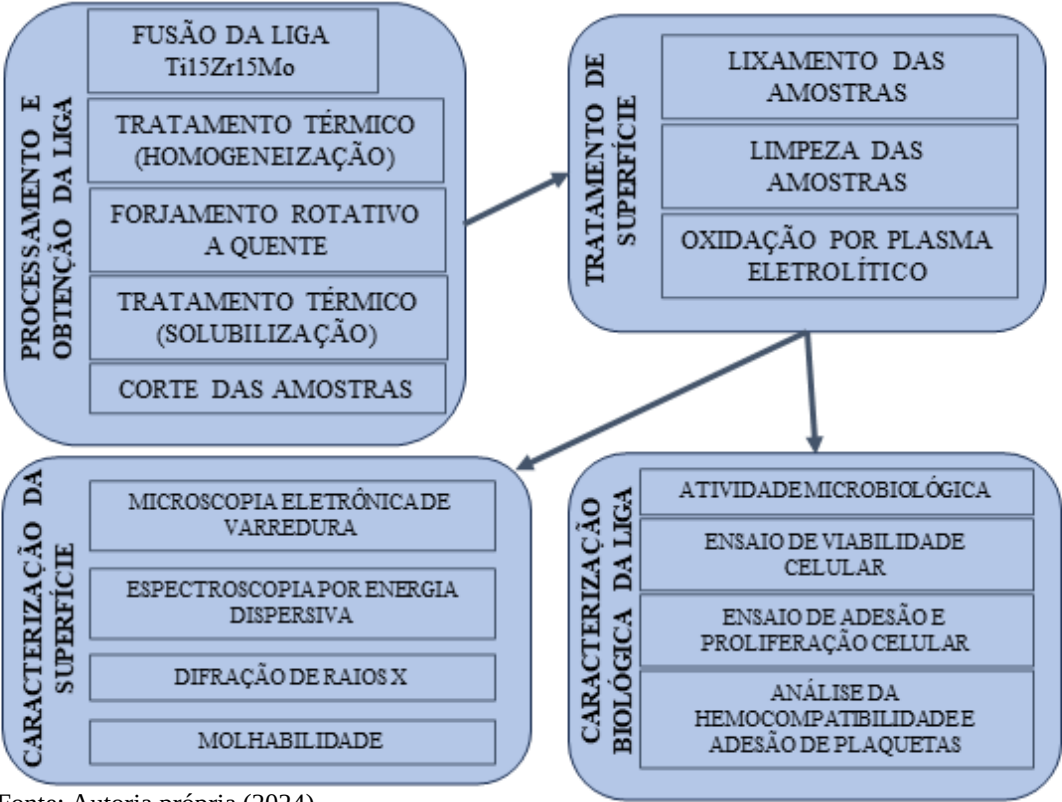
H3: Alguns autores sugerem que a adição de íons de estrôncio na superfície da amostra durante o tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico (PEO) pode melhorar a resposta celular.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 18 é apresentado o fluxograma empregado para o desenvolvimento desta pesquisa. A metodologia empregada foi dividida em 4 etapas: processamento e obtenção da liga (Figura 18a), tratamento de superfície (Figura 18b), caracterização da superfície (Figura 18c) e caracterização biológica (Figura 18d). Após a modificação da superfície da liga Ti15Zr15Mo, foi realizado um estudo para analisar quais grupos seriam mais adequados para

continuar com a caracterização biológica, visando aplicação biomédica. Os grupos de estudo estão apresentados no Quadro 3.

Figura 18 - Fluxograma da metodologia empregada nesta pesquisa, dividida em 4 etapas: Processamento e obtenção da liga; Tratamento de superfície; Caracterização da superfície e Caracterização biológica.



Fonte: Autoria própria (2024).

Quadro 3 - Grupos de estudo utilizados no Experimento 1.

Grupos	Tratamentos
Grupo 1 (G1) – TZM	Liga Ti15Zr15Mo lixada (Grupo Controle)
Grupo 2 (G2) – TZM PEO	Liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície PEO
Grupo 3 (G3) – TZM PEO 0,01M Sr	Liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície PEO com 0,01M de acetato de estrôncio no eletrólito
Grupo 4 (G4) – TZM PEO 0,04M Sr	Liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície PEO com 0,04M de acetato de estrôncio no eletrólito
Grupo 5 (G5) – TZM PEO 0,07M Sr	Liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície PEO com 0,07M de acetato de estrôncio no eletrólito
Grupo 6 (G6) – TZM PEO 0,1M Sr	Liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície PEO com 0,1M de acetato de estrôncio no eletrólito

Fonte: Autoria própria (2024).

3.2.1 Processamento e obtenção da liga

A liga experimental Ti15Zr15Mo utilizada neste trabalho foi obtida por fusão, conforme a rota de processamento proposta por Alves (1998). As etapas de corte, decapagem química, pesagem dos metais, fusão da liga e o tratamento térmico de homogeneização descritos a seguir foram realizadas no Laboratório de Processamento de Materiais do

Departamento de Materiais e Tecnologia da Faculdade de Engenharia e Ciências de Guaratinguetá (FEG) – Unesp. O tratamento térmico de solubilização foi realizado na Faculdade de Ciências/Unesp, campus de Bauru, no Laboratório de Anelasticidade e Biomateriais.

Os metais utilizados na fusão da liga foram recebidos na forma de chapas e arames, cedidos pela Faculdade de Ciências/Unesp-Campus Bauru. As chapas e arames foram cortadas em pequenos pedaços, utilizando tesoura de bancada e alicates. Após o corte, foram limpos pelo processo de decapagem química, com uma solução constituída por ácido fluorídrico e ácido nítrico (na proporção de 1:3). A solução foi colocada em um béquer e os pequenos pedaços dos metais puros foram mergulhados na solução até a remoção das impurezas. Então, foram retirados do béquer, enxaguados em água corrente para a remoção de resíduos e secos com convecção a ar.

Posteriormente à limpeza, os metais foram pesados em balança analítica, de acordo com a composição da liga Ti15Zr15Mo (% em peso), conforme pode-se observar na Figura 19. Depois, foram colocados em ordem de densidade, em um cadinho de cobre refrigerado à água, no interior do forno a arco voltaico. A densidade dos elementos puros Ti, Zr e Mo são 4,5g/cm³, 6,52 g/cm³ e 10,22 g/cm³, respectivamente.

Figura 19 - Metais empregados na obtenção da liga Ti15Zr15Mo: (a) titânio; (b) zircônio e (c) molibdênio.



Fonte: Autoria própria (2024).

Em seguida, a câmara do forno foi fechada e realizou-se o processo de purga, que consiste na manutenção do vácuo, aplicado para a remoção dos elementos químicos contaminantes existentes na atmosfera do forno. Após, é realizada a injeção e a retirada de argônio, repetindo-se 5 vezes. Este processo garante que dentro da câmara não fique resíduo de gases que possam contaminar a liga durante a fusão.

A fusão da liga foi realizada em um forno com atmosfera inerte de argônio, fonte com capacidade máxima de 220 A, da marca Bambozzi e modelo TRR425DC (Figura 20). O

processo de fusão ocorre por meio da passagem de corrente elétrica entre o eletrodo inerte de tungstênio e o cadinho de cobre.

Figura 20 - Forno a arco voltaico utilizado no processamento da liga Ti15Zr15Mo.



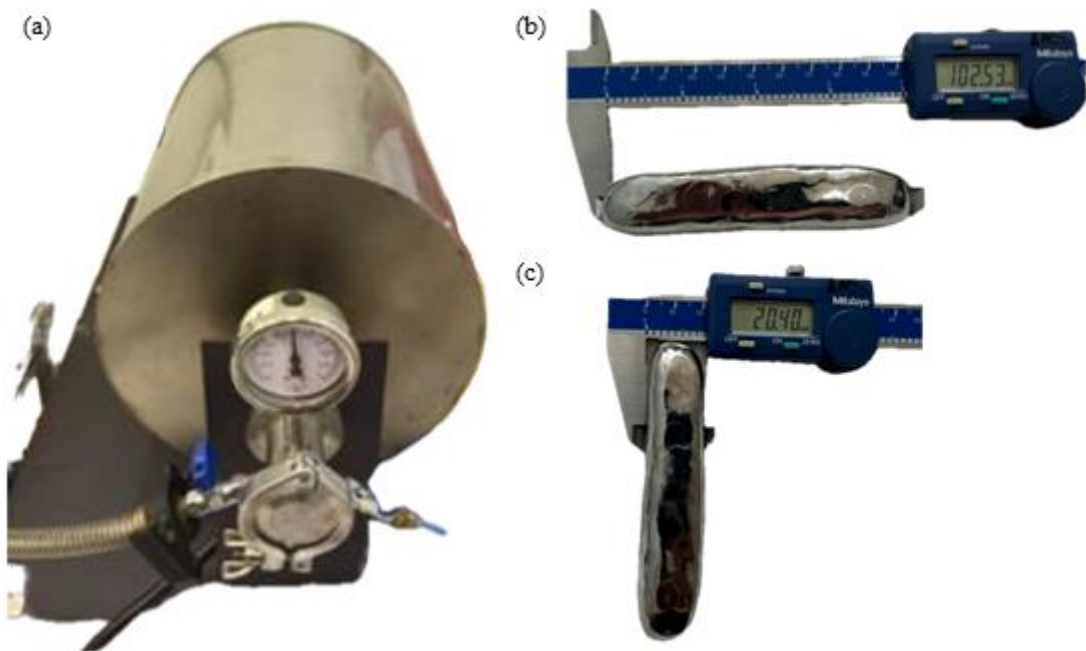
Fonte: Autoria própria (2024).

Posteriormente ao processo de purga, foi realizada a fusão dos metais, que é dividida em duas etapas para que seja mais segura e eficiente. Esta divisão em etapas evita a formação de inclusões e o superaquecimento da câmara, que pode dilatar, contaminar a atmosfera e, conseqüentemente, a liga. A primeira etapa é a fusão de pequenas quantidades de material – denominadas como “botão” – com cerca de 30g. A fusão de cada botão é realizada pelo menos 10 vezes, com rotação do botão em 180° após cada passe, com o objetivo de fundir todo o material presente no cadinho. A segunda etapa consiste em unir 3 botões para formar um lingote. Os lingotes foram pesados em balança analítica após a fusão para confirmar que não houve perda de massa.

Assim, para garantir a homogeneidade da composição química da liga, foi realizado o tratamento térmico de homogeneização. Este tratamento é feito em um forno tubular, com atmosfera inerte de argônio, no qual o cadinho é inserido em um tubo de quartzo. Os lingotes foram colocados em um cadinho de alumina, inseridos no tubo de quartzo e iniciou-se o

processo de purga, mantendo o vácuo durante todo o tempo do tratamento térmico. A homogeneização foi realizada a uma temperatura de 1000°C, sob taxa de aquecimento de 15,8°C/min, durante 24 horas e com resfriamento lento dentro do forno (KONATU et al., 2014). Na Figura 21 é possível observar o equipamento utilizado na homogeneização (Figura 21a) e o lingote após o tratamento térmico, com aproximadamente 103 cm de comprimento e 20 cm de largura (Figura 21b e Figura 21c).

Figura 21 - (a) Forno tubular utilizado no tratamento térmico de homogeneização; (b) e (c) Lingote obtido após a fusão dos metais e a homogeneização.



Fonte: Autoria própria (2024).

Devido à dureza do material, foi realizado o forjamento a quente nos lingotes tratados termicamente na homogeneização. O objetivo desta etapa é garantir a uniformidade geométrica do lingote e a obtenção de barras com 10 mm de diâmetro. O forjamento a quente foi realizado na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), no Laboratório de Ensaios Termomecânicos, utilizando o equipamento Fenn Newington CT – 3F, que opera a uma frequência de 60 Hz e possui martelos com diferentes diâmetros que aplicam forças de compressão em sentido radial no material.

Inicialmente, os lingotes foram aquecidos em um forno com temperatura de 1000°C, durante 15 minutos. Posteriormente, foram levados ao equipamento de forjamento e depois retornaram ao forno. Os martelos têm que ser trocados a cada passe, reduzindo assim o diâmetro do lingote e conferindo uma forma regular. Ao final do processo, o lingote apresentou rebarbas e óxidos gerados pelo trabalho a quente, os quais foram removidos com

um esmeril. Na Figura 22 pode-se observar o equipamento para o forjamento a quente, com os martelos e o lingote após este processo.

Figura 22 - Equipamento utilizado durante o forjamento a quente.



Fonte: Autoria própria (2024).

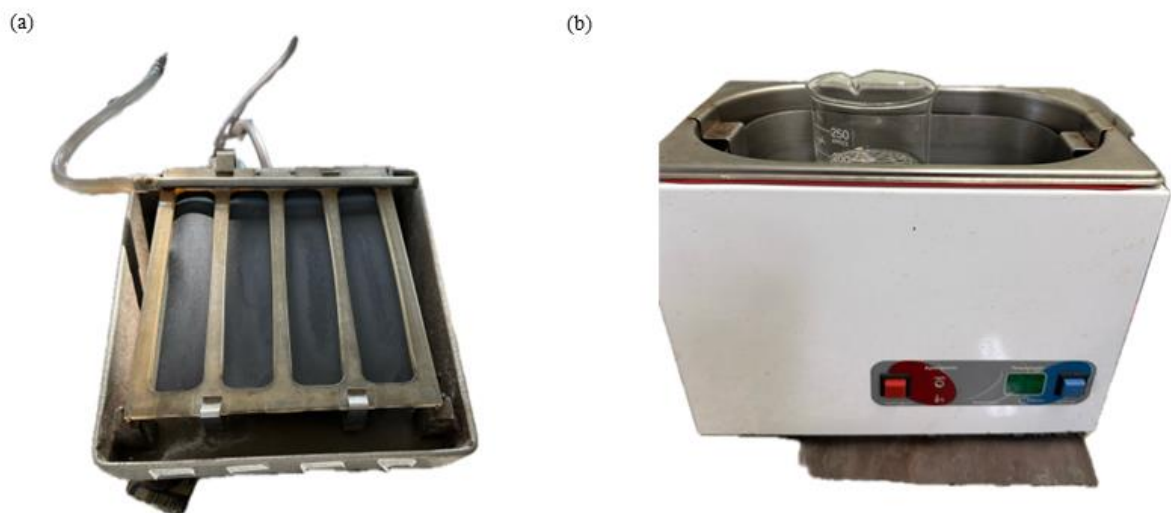
Após o forjamento a quente, foi realizado o tratamento térmico de solubilização para estabilizar a fase β e eliminar a influência do forjamento a quente na microestrutura. O lingote foi posicionado sobre um cadinho de alumina no forno tubular, com atmosfera inerte de argônio. O forno foi aquecido com uma taxa de $16,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 950°C , durante 120 min, com resfriamento brusco em água. Assim como o tratamento térmico de homogeneização, a solubilização foi realizada em um forno resistivo de câmara tubular de quartzo, sob vácuo e também foi realizado o processo de purga na câmara tubular.

Discos com 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram seccionados das barras, utilizando um equipamento de corte de precisão Isomet 1000 (Buehler) e discos diamantados, no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Materiais e Tecnologia da FEG-Unesp.

3.2.2 Tratamento de superfície da liga Ti15Zr15Mo

O preparo das amostras da liga Ti15Zr15Mo antes do tratamento de superfície consistiu no processo de metalografia, no qual as amostras foram lixadas com lixas abrasivas de carbeto de silício com granulometrias de #100 até #600 (Figura 23a). Em seguida, as amostras foram limpas para retirada de impurezas, em banho ultrassônico (modelo UltraCleaner 800 A, marca Unique, Figura 23b) em água deionizada, por 15 min, e secas com convecção de ar (KONATU et al., 2023). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Metalografia do Departamento de Materiais e Tecnologia da FEG-Unesp.

Figura 23 - (a) Lixamento com lixas abrasivas sob água corrente e (b) Banho ultrassônico.



Fonte: Autoria própria (2024).

O tratamento de superfície das amostras da liga Ti15Zr15Mo foi realizado por oxidação por plasma eletrolítico (PEO), com o equipamento MAO-30, Plasma Technology Ltd. (Hong Kong, China), conforme Figura 24. Este tratamento foi realizado em parceria com o Instituto de Ciência e Tecnologia, campus de Sorocaba – Unesp, no Laboratório de Plasma Tecnológico (LabTec).

Figura 24 - (a) Equipamento MAO-30, utilizado para o tratamento de superfície da liga Ti15Zr15Mo, (b) e (c) Esquema para a realização da PEO.



Fonte: Autoria própria (2024).

O eletrólito utilizado na PEO é composto por 0,2 mol/L de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0,1 mol/L de NaH_2PO_4 e variou-se a concentração de $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em 0,1M, 0,07 M, 0,04 M e 0,01 M (ZHANG et al., 2022). Primeiramente, o eletrólito foi preparado, sendo que os reagentes foram pesados conforme composição mencionada e adicionados em um béquer e, posteriormente, agitados magneticamente para melhor dissolução da solução.

Após o preparo do eletrólito, foi despejado 500 mL de solução no recipiente do equipamento e montou-se o esquema do tratamento, no qual 2 amostras foram fixadas em pinças alinhadas paralelamente e então, imersas na solução (Figura 24b e Figura 24c). Os parâmetros foram ajustados no painel de controle de acordo com as determinações prévias estudadas pelos autores: tempo de 10 min, com fonte de alimentação C/C, frequência de 400 Hz, tensão de 300 V e ciclo de trabalho de 15% (ZHANG et al., 2022). Assim, foi realizado o ensaio de oxidação por plasma eletrolítico (PEO) para modificar a superfície do material. A tensão de 300 V é considerada baixa em relação a outros estudos utilizando o método PEO, porém é importante diminuir esse valor para que o processo seja favorável ao meio ambiente (KOSTELAC et al., 2022).

Todos os ensaios foram realizados sob temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. A densidade de corrente variou de aproximadamente 3 a 6 A, ao longo de todos os ensaios. O pH do eletrólito durante os tratamentos foi no intervalo de 8,1 a 8,6. Após a conclusão dos experimentos, as amostras foram lavadas com água destilada para eliminar resíduos químicos da solução e, posteriormente, secas ao ar.

3.2.3 Caracterização da superfície da liga Ti15Zr15Mo

A caracterização foi realizada nas amostras da liga Ti15Zr15Mo após tratamento de superfície por oxidação por plasma eletrolítico, sendo considerados o grupo controle (G1 – TZM), amostra após tratamento de superfície PEO sem Sr (G2 – TZM PEO) e mais 4 grupos conforme a concentração do acetato de estrôncio na solução do eletrólito da PEO, da menor quantidade para a maior: 0,01M (G3 – TZM PEO 0,01 M Sr), 0,04M (G4 – TZM PEO 0,04 M Sr), 0,07M (G5 – TZM PEO 0,07 M Sr) e 0,1 M (G6 – TZM PEO 0,1 M Sr).

3.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva

A morfologia e a composição da superfície foram avaliadas a partir do uso de um microscópio eletrônico de varredura ZEISS-EVO LS15, com sonda de EDS, OXFORD Xplore 30, no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Materiais e Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG) – Unesp (Figura 25).

Figura 25 - (a) Microscópio eletrônico de varredura e (b) Espectrômetro detector de energia dispersiva, utilizados para a caracterização da morfologia e da análise elementar das amostras da liga de Ti15Zr15Mo após o tratamento da superfície por oxidação por plasma eletrolítico.



Fonte: Autoria própria (2024).

3.2.3.2 Difração de raios X

Um difratômetro BRUKER-D8 Advance foi empregado na análise estrutural, usando radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$), no intervalo de $20^\circ < 2\theta < 90^\circ$, com passo de $0,04^\circ$, tempo de contagem de 0,16 s, abertura de fenda de 0,6 mm, corrente de 15 mA e tensão de 40kV. Pode-se observar o equipamento utilizado na Figura 26, do Laboratório de Difração e Fluorescência de Raios X (LADIF), no Departamento de Materiais e Tecnologia da FEG-Unesp.

Figura 26 - Difratorômetro utilizado para realizar a caracterização da liga Ti15Zr15Mo após a modificação da superfície por difração de raios X.



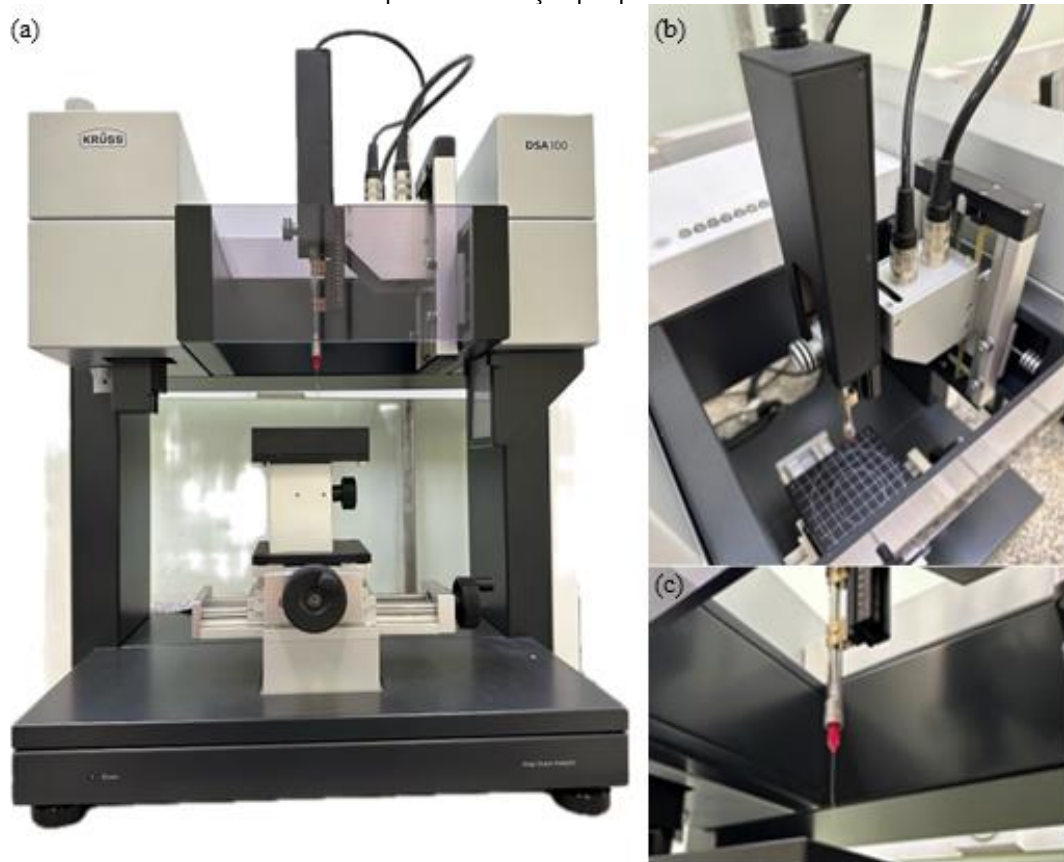
Fonte: Autoria própria (2024).

Os dados foram refinados pelo método Rietveld, por meio do *software* Profex, versão 4.3.3. As fases foram identificadas utilizando fichas da *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD) e com auxílio dos *softwares* Crystallographica Search-Match (versão 2.1.1.1, Oxford Cryosystems) e HighScore (versão 3.0.1, PANalytical B. V.).

3.2.3.3 Molhabilidade

As medidas do ângulo de contato da superfície da liga de Ti15Zr15Mo após PEO foram realizadas no Laboratório de Biomateriais no Departamento de Materiais e Tecnologia da FEG – Unesp, com equipamento goniômetro automatizado DAS Kruss 100S, que pode ser observado na Figura 27. A molhabilidade foi investigada empregando o método de gota sésil, no qual uma agulha dispensa o líquido sobre a superfície e um programa de computador determina o ângulo entre a gota do líquido e a superfície. A característica hidrofílica é identificada quando o ângulo é menor que 90° e a característica hidrofóbica, quando o ângulo é maior que 90°. As medidas foram realizadas à temperatura controlada de 17°C, com gotas de 5 µL. De maneira a obter-se uma média dos valores do ângulo de contato, 3 gotas foram depositadas em regiões diferentes da superfície da amostra e o ângulo de contato foi medido em cada região.

Figura 27 - Goniômetro utilizado para a caracterização da molhabilidade das amostras da liga Ti15Zr15Mo após o tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico.



Fonte: Autoria própria (2024).

3.2.4 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo – Análise da atividade microbológica

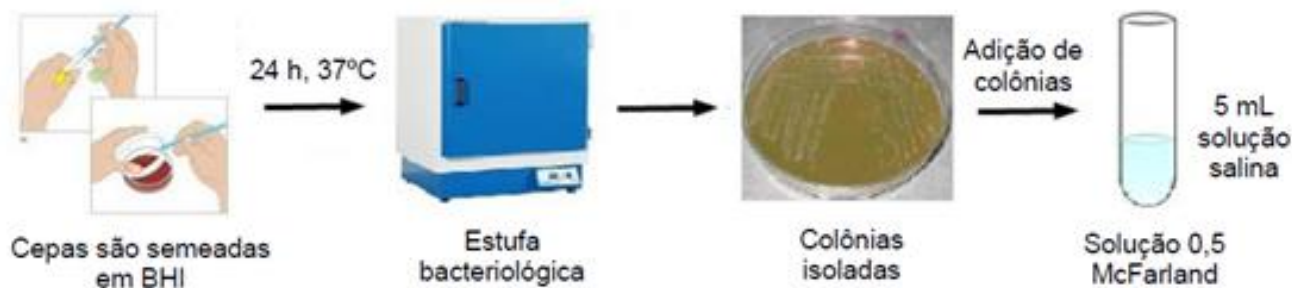
A atividade antimicrobiana foi investigada nas amostras da liga Ti15Zr15Mo após tratamento de superfície por oxidação por plasma eletrolítico, sendo considerados os mesmos grupos da caracterização da superfície: grupo controle (G1 – TZM), amostra após tratamento de superfície PEO sem Sr (G2 – TZM PEO) e mais 4 grupos conforme a concentração do acetato de estrôncio na solução do eletrólito da PEO, da menor quantidade para a maior: 0,01M (G3 – TZM PEO 0,01 M Sr), 0,04M (G4 – TZM PEO 0,04 M Sr), 0,07M (G5 – TZM PEO 0,07 M Sr) e 0,1 M (G6 – TZM PEO 0,1 M Sr).

O teste para a análise de atividade bactericida das amostras foi realizado no Laboratório de Microbiologia pertencente ao Departamento de Biomateriais da UNIFEI – Campus Itajubá, sob responsabilidade da Profa. Dra. Daniela Sachs. Para realizar o experimento, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), que se

destacam por estarem presentes na maioria das cepas isoladas de pacientes nos hospitais e ocasionam uma gama de doenças (PILLONETTO et al., 2021).

Primeiramente, foram preparados o meio BHI, que é uma solução estéril de infusão de cérebro e coração, utilizando 52 g de BHI diluído em 1000 mL de água destilada. A solução de BHI foi esterilizada em autoclave a 127°C por um período de 1h. Após esse procedimento, a cepa foi inoculada em tubo de ensaio com 3 mL de BHI e levado à estufa a 37°C por 24h (realizado em duplicata). Após o período de incubação, utilizou-se 10 µL da solução preparada com a cepa para estriar as placas de petri previamente preparadas com ágar. Depois, as placas foram levadas à estufa bacteriológica a 37°C por um período de 24h para o crescimento do biofilme. Finalmente, uma alíquota da colônia de bactérias cultivada foi adicionada em um tubo de ensaio com 3 mL de solução NaCl 0,9% até a obtenção da concentração do meio líquido na escala de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/mL). Pode-se observar o esquema da preparação da solução McFarland na Figura 28.

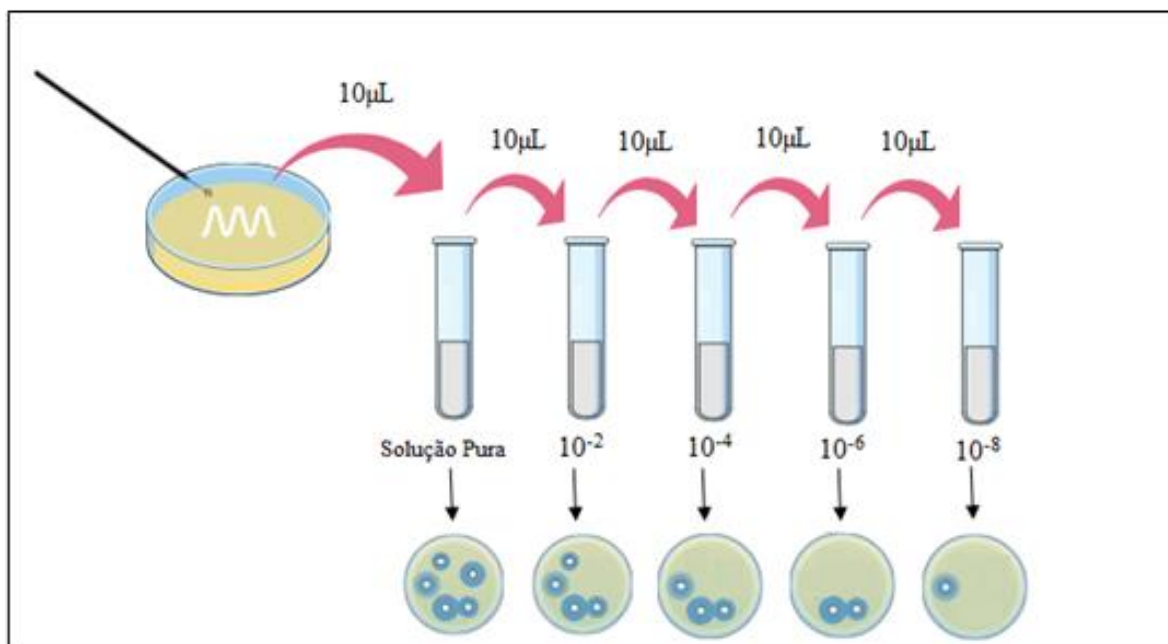
Figura 28 - Esquema da sequência de preparação da solução McFarland.



Fonte: TAINARA (2022).

As amostras de todos os grupos foram esterilizadas em ultravioleta (UV) por 30 minutos. Em seguida, elas foram colocadas em uma placa de 12 poços e recobertas com 3 mL de BHI e, em cada poço, foi adicionado 100 µL da suspensão 0,5 McFarland. Novamente, as placas foram levadas na estufa a 37°C por 48h. Após o período de incubação, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio com 3 mL de solução salina, levadas ao agitador *vortex* por 3 minutos e lavadas em ultrassom por um período de 10 minutos, dispersando assim os biofilmes formados para gerar uma solução bacteriana pura. A partir dessa solução, foram realizadas cinco diluições (pura, 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8}) em solução salina 0,9%, como observado na Figura 29. Posteriormente, foi inoculado uma gota de cada diluição em placa de petri preparada com ágar e, finalmente, as placas foram levadas a estufa à 37°C por 24h.

Figura 29 - Esquema representando o ensaio antibacteriano.



Fonte: RIBEIRO (2019).

Ao final do processo demonstrado acima, verificou-se o crescimento das colônias na superfície das placas, as quais foram contadas por meio do cálculo das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), descrita na Equação 2 (ZHENG *et al.*, 2012).

$$UFC (mL^{-1}) = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias}}{\text{diluição da amostra} \times \text{volume inoculado}} \quad (2)$$

Os resultados obtidos foram transformados em $\log_{10}$ e analisados pelo teste t de *student*. O cálculo foi realizado por meio do *software* GraphPad Prism. Foi considerado $p < 0,05$ para indicar uma diferença estatística significativa entre as amostras recobertas e sem recobrimento. Além dos resultados estatísticos, foi realizada a análise morfológica das amostras com microscopia eletrônica de varredura (microscópio ZEISS-EVO LS15), no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG) – Unesp (Figura 25a). O preparo das amostras para o MEV foi a metalização com ouro porque a bactéria na superfície das amostras possui pouca condutividade elétrica, dificultando o escoamento dos elétrons durante a análise do microscópio. Assim, foi utilizado o metalizador de alto vácuo de marca Quorum e modelo Q150R ES (Figura 30), localizado no mesmo laboratório de microscopia eletrônica de varredura. O próprio metalizador tem um programa para ligas metálicas, então o processo foi feito de maneira automática.

Figura 30 - Metalizador de alto vácuo.



Fonte: Autoria própria (2024).

3.2.5 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo – Ensaios *in vitro*

Após a caracterização da superfície da liga de Ti15Zr15Mo dos 6 grupos mencionados anteriormente, foi escolhida uma condição da molaridade do estrôncio para seguir com os estudos *in vitro*. Com base nas informações obtidas, o eletrólito da PEO com 0,07 M de acetato de estrôncio apresentou resultados mais adequados para aplicação biomédica, portanto, a escolha foi avaliar 3 grupos: Grupo 1 (G1 – Grupo controle – TZM), Grupo 2 (G2 – TZM PEO) e Grupo 3 (G3 – TZM PEO 0,07 M Sr).

Os ensaios *in vitro* foram realizados na *Colorado State University*, sob a supervisão do Prof. Dr. Ketul Popat. As células progenitoras da medula óssea humana (hBMSCs) foram cultivadas em meio basal (α MEM) contendo 15% de soro ósseo fetal (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina e estreptomicina, a 37°C em uma incubadora com 5% de CO₂. Antes de semear as células na superfície dos discos de titânio, estes foram esterilizados sob luz ultravioleta por 60 minutos, de cada lado. Então, as amostras foram colocadas em poços individuais em uma placa de 24 poços.

3.2.5.1 Viabilidade celular

Antes do ensaio ser realizado, uma suspensão de células (50 μ l) contendo 2×10^4 células foi colocada nos discos e, após 1 hora, 1 mL de meio basal foi adicionado aos poços contendo os discos. As células foram cultivadas por 1 e 7 dias. O meio foi trocado duas vezes por semana. Para a análise de viabilidade, as hBMSCs foram incubadas em meio basal fresco contendo reagente AlamarBlue® a 10% (Thermo Fisher Scientific) por 2 horas, a 37 °C, em uma incubadora com 5% de CO₂. Posteriormente, 100 μ l do meio foi aliqotado em poços individuais de uma placa de 96 poços e a densidade óptica da solução foi medida. A porcentagem de redução de AlamarBlue® foi calculada utilizando as amostras controle negativo, que contêm apenas o meio de cultura e o corante, e controle positivo, as quais foram cultivadas células (MADRUGA et al., 2021a).

3.2.5.2 Ensaio de adesão e proliferação celular

Os ensaios de adesão e proliferação celular foram realizados por meio de cultura de células em contato com a superfície das amostras. Uma suspensão de células de 200 μ l, contendo 2×10^4 células, foi adicionada aos poços que continham as amostras e foram mantidas em contato com as amostras por 1 e 7 dias de cultura. Os núcleos corados com DAPI foram fotografados em um microscópio de fluorescência, com ampliação de 10 kx, e contados com o auxílio do *software* ImageJ, no qual pelo menos quatro áreas aleatórias por amostra foram fotografadas para a análise. Assim, a microscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar a quantidade de células aderidas e crescidas (MADRUGA et al., 2021a).

3.2.5.3 Análise da hemocompatibilidade e adesão de plaquetas

Para este estudo, dois indivíduos saudáveis consentiram em doar sangue por flebotomia venosa, usando procedimentos aprovados pelo Conselho de Revisão Institucional da *Colorado State University* (CSU), de acordo com os "Princípios Orientadores para Pesquisa Ética" do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos. O sangue foi coletado por um flebotomista (em tubos de vácuo revestidos com EDTA de 10 mL) e foi centrifugado (100 $\times$ g por 15 min). O plasma contendo plaquetas e leucócitos foi removido e deixado em

repouso por 10 min antes do uso, para obter plasma rico em plaquetas (PRP). A microscopia de fluorescência foi usada para avaliar a adesão de plaquetas na superfície das amostras da liga Ti15Zr15Mo, em três amostras de cada grupo (CÂMARA et al., 2020; SABINO et al., 2020). Foi utilizado como controle na cultura o tecido de poliestireno. Cada amostra foi colocada no poço de uma placa de 24 poços e incubada com 500 μ L de PRP (37 °C por 2 h, com agitação de 100 rpm). Após a incubação com PRP, as amostras foram enxaguadas com PBS e água antes da análise, para remover plaquetas não aderidas. As amostras foram então coradas com corante vivo calceína-AM (Invitrogen) em PBS (2 μ M), por 30 min, com agitação de 100 rpm, em temperatura ambiente, protegidas da luz, e foram analisadas com um microscópio de fluorescência ZEISS-AXIOVISION usando um filtro de 493/514 nm, e cinco imagens de locais selecionados aleatoriamente foram tiradas de cada uma das três amostras por condição (MADRUGA et al., 2021b). O *software* ImageJ foi utilizado para calcular a porcentagem da área com plaquetas aderidas.

4 EXPERIMENTO 2

4.1 OBJETIVOS E HIPÓTESES

Avaliar por meio da realização de estudos *in vitro*, a adesão e proliferação celular na superfície da Ti15Zr15Mo (TZM) após tratamento de superfície empregando o método químico PEO (Oxidação por Plasma Eletrolítico) comparando os resultados do tratamento sem e com calcinação.

Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- a) Modificar a superfície da liga Ti15Zr15Mo por oxidação por plasma eletrolítico, de maneira a obter camada porosa;
- b) Caracterizar a superfície da liga Ti15Zr15Mo, comparando os grupos testados quanto às melhores propriedades visando aplicação biomédica;
- c) Realizar a análise biológica das amostras para verificar a viabilidade na aplicação como biomaterial.

As hipóteses desta pesquisa são:

H1: A liga Ti15Zr15Mo sem tratamento de superfície é indicada para aplicações biomédicas, mas apresenta baixa adesão celular;

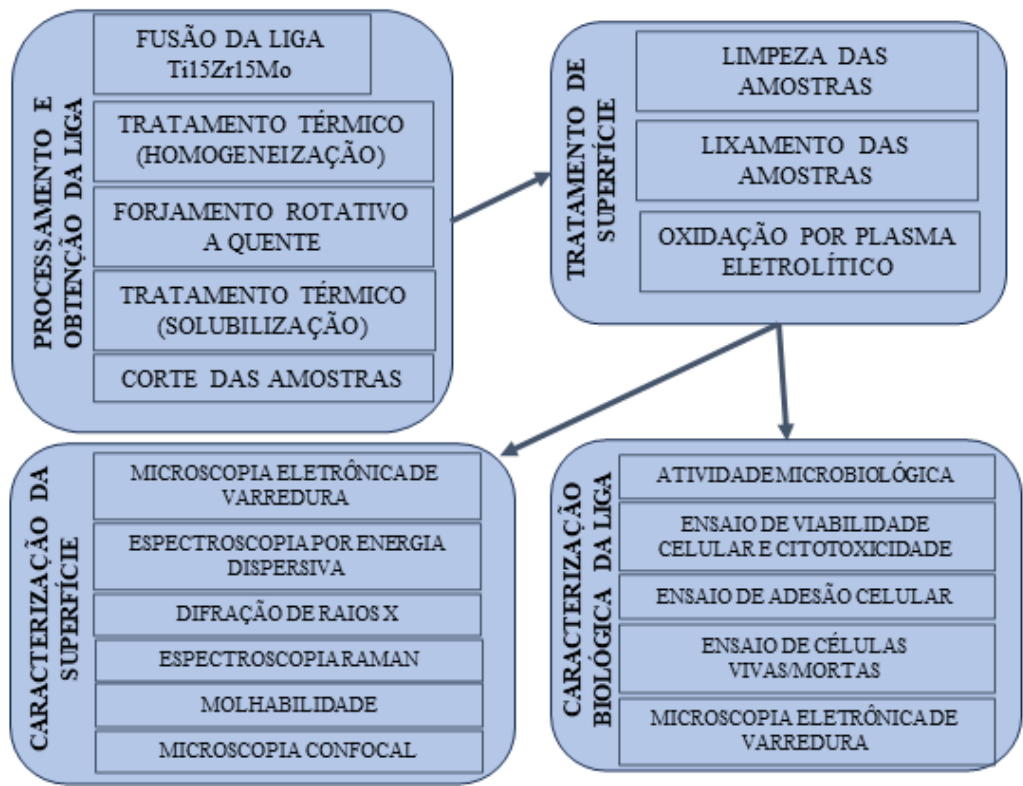
H2: O tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico com fosfato de cálcio (CaP) pode proporcionar maior adesão celular quando comparado à liga Ti15Zr15Mo sem modificação da superfície;

H3: Alguns autores sugerem que a calcinação das amostras após tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico pode melhorar a resposta celular.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 31 é apresentado o fluxograma com as etapas empregadas para o desenvolvimento desta pesquisa. De maneira geral, a metodologia utilizada é semelhante à do Experimento 1, com algumas diferenças que serão explicadas nas próximas seções. Os grupos de estudo estão apresentados no Quadro 4.

Figura 31 - Fluxograma da metodologia empregada nesta pesquisa, dividida em 4 etapas: Processamento e obtenção da liga; Tratamento de superfície; Caracterização da superfície e Caracterização biológica.



Fonte: Autoria própria (2024).

Quadro 4 - Grupos de estudo utilizados no Experimento 2.

Grupos	Tratamentos
Grupo 1 (G1) – TZM	Liga Ti15Zr15Mo lixada (Grupo Controle)
Grupo 2 (G2) – TZM PEO	Liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície PEO
Grupo 3 (G3) – TZM PEO Calcinado	Liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície PEO, seguido de calcinação
Grupo 4 (G4) – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado	Liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície PEO com 0,07 M de acetato de estrôncio no eletrólito, seguido de calcinação

Fonte: Autoria própria (2024).

4.2.1 Processamento e obtenção da liga

O processamento e a obtenção da liga foram realizados da mesma maneira que consta no item 3.2.1.

4.2.2 Tratamento de superfície da liga Ti15Zr15Mo

O preparo das amostras da liga TZM foi semelhante ao que consta no item 3.2.2, com algumas distinções, conforme pode-se observar na Figura 32. As principais diferenças são o lixamento com lixas abrasivas de carbeto de silício com granulometrias de #100 a #1500 (LIU et al., 2015) e também limpeza em banho ultrassônico com álcool etílico após a limpeza com água destilada (modelo UltraCleaner 800 A, marca Unique), com o objetivo de esterilizar melhor as amostras. Após lixamento e banho ultrassônico, foram separadas amostras para serem utilizadas como Grupo 1 (Grupo Controle).

Figura 32 - Esquema ilustrativo do Experimento 2.



Fonte: Autoria própria (2024).

O tratamento de superfície das amostras da liga TZM foi realizado por oxidação por plasma eletrolítico (PEO), com o equipamento MAO-30, Plasma Technology Ltd. (Hong Kong, China), com as mesmas condições, de acordo com informações do item 3.2.2.

Dessa vez foram utilizados dois eletrólitos, de maneira a compararmos as melhores condições em cada grupo. Com isso, o primeiro eletrólito é da PEO sem estrôncio e o segundo é com a quantidade de acetato de estrôncio que foi considerada mais adequada quando comparada às demais estudadas, conforme explicado na discussão de resultados.

- Eletrólito 1: 0,2 mol/L de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ e 0,1 mol/L de NaH_2PO_4 ;
- Eletrólito 2: 0,2 mol/L de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0,1 mol/L de NaH_2PO_4 e 0,07 mol/L de $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Todos os ensaios foram realizados sob temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e o pH do eletrólito ficou no intervalo de 8,2 e 8,8. A densidade de corrente variou de aproximadamente 3,5 a 5,5 A, ao longo de todos os ensaios. Após a conclusão dos experimentos, as amostras foram lavadas com água destilada para eliminar resíduos químicos da solução, limpas em banho ultrassônico com álcool etílico por 1 min e, posteriormente, secas ao ar.

Após o tratamento de superfície de PEO com o eletrólito 1, foram separadas amostras para serem utilizadas como Grupo 2. As demais foram calcinadas a uma taxa de aquecimento de $1^\circ\text{C}/\text{min}$, temperatura de 450°C , durante 60 min e resfriamento lento dentro do forno (KONATU et al., 2023). Assim, depois da calcinação, as amostras da PEO com o eletrólito 1 são do Grupo 3 e as do eletrólito 2 são do Grupo 4. O tratamento térmico de calcinação foi realizado no Laboratório de Biomateriais da FEG-Unesp, em forno mufla EDG Equipamentos – 7000, modelo EDG 3P-S, com aquecimento por resistência elétrica.

4.2.3 Caracterização da superfície da liga Ti15Zr15Mo

A caracterização foi realizada nas amostras da liga Ti15Zr15Mo após tratamento de superfície por oxidação por plasma eletrolítico, sendo considerados o grupo controle (G1 – TZM), amostra após tratamento de superfície PEO sem Sr (G2 – TZM PEO), amostra após tratamento de superfície PEO sem Sr seguida de calcinação (G3 – TZM PEO Calcinado) e amostra após tratamento de superfície PEO com 0,07 M de Sr seguida por calcinação (G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado).

4.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva

O estudo morfológico e de composição das amostras utilizou-se o microscópio MEV (S-4800; Hitachi, Tóquio, Japão) equipado com um espectroscópio de raios X de energia

dispersiva (EDS), no Laboratório Central de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Okayama (Japão).

4.2.3.2 Difração de raios X

Um difratômetro X'PERT PRO, da marca PANalytical foi empregado na análise estrutural, usando radiação Cu K α ($\lambda=1,5418$ Å), no intervalo de $20^\circ < 2\theta < 90^\circ$, com passo de $0,04^\circ$, tempo de contagem de 0,16 s, abertura de fenda de 0,6 mm, corrente de 15 mA e tensão de 40kV. Pode-se observar o equipamento utilizado na Figura 33, do Laboratório de Plasmas Tecnológicos, da Unesp de Sorocaba.

Figura 33 - Difratômetro utilizado para realizar a caracterização da liga Ti15Zr15Mo após a modificação da superfície por difração de raios X.



Fonte: Autoria própria (2024).

Os dados foram refinados pelo método Rietveld, por meio do *software* Profex, versão 4.3.3. As fases foram identificadas utilizando fichas da Inorganic Crystal Structure Database (ICSD) e com auxílio dos *softwares* Crystallographica Search-Match (versão 2.1.1.1, Oxford Cryosystems) e HighScore (versão 3.0.1, PANalytical B. V.).

4.2.3.3 Molhabilidade

As medidas do ângulo de contato da superfície da liga de Ti15Zr15Mo foram realizadas no Laboratório de Biomateriais no Departamento de Materiais e Tecnologia da FEG – Unesp, com o mesmo equipamento e procedimento conforme descrito no item 3.2.3.3.

4.2.3.4 Espectroscopia Raman

O equipamento LABRam HR Evolution, da marca Horiba Scientific e modelo Olympus BX41 foi utilizado para a espectroscopia Raman com espectro 1000, tempo de aquisição de 1 segundo, acumulação de 120 e potência do laser de 25%. Pode-se observar na Figura 34 o equipamento empregado do Laboratório de Espectroscopia Raman, no INPE em São José dos Campos.

Figura 34 - Equipamento utilizado para a espectroscopia Raman.



Fonte: Autoria própria (2024).

4.2.3.5 Microscopia Confocal

A microscopia confocal foi realizada para mapear a superfície das amostras e dar origem à imagem 3D delas. A caracterização foi realizada em um microscópio LEICA DCM 3D (Figura 35), no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG) – Unesp. Durante a análise foi utilizada luz led azul de 410 nm, objetiva de 10x e abertura numérica do microscópio de 0,30. Para plotar o gráfico foi utilizado o programa de microscopia confocal de domínio público Gwyddion.

Figura 35 - Microscópio confocal.



Fonte: Autoria própria (2024).

4.2.4 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo

A caracterização biológica foi realizada nas amostras da liga TZM após tratamento de superfície PEO, sendo considerados os mesmos grupos da caracterização da superfície: grupo controle (G1 – TZM), amostra após tratamento de superfície PEO sem Sr (G2 – TZM PEO), amostra após tratamento de superfície PEO sem Sr seguida de calcinação (G3 – TZM PEO Calcinado) e amostra após tratamento de superfície PEO com 0,07 M de Sr seguida por calcinação (G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado).

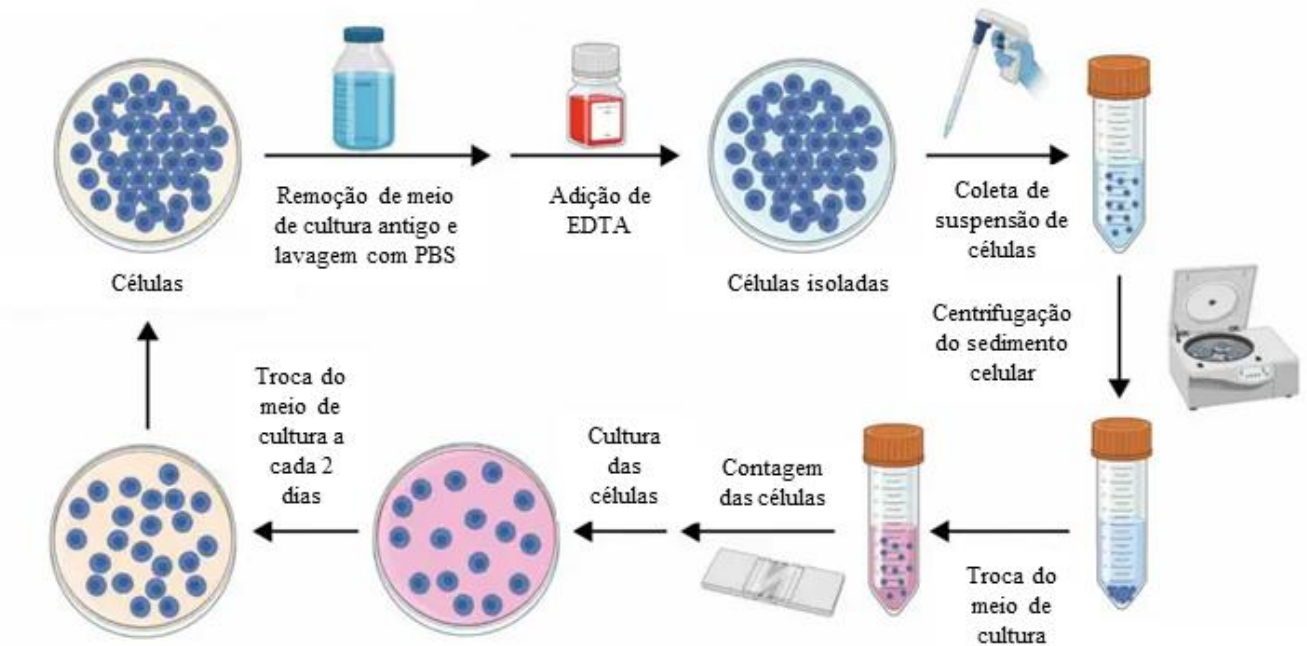
4.2.4.1 Análise da atividade microbiológica

O teste de análise microbiológica seguiu a mesma metodologia conforme consta no item 3.2.4.1.

4.2.4.2 Estudos *in vitro*

Células progenitoras de medula óssea humana (hBMSCs), adquiridas da RIKEN (Japão), foram cultivadas em meio basal (α MEM) contendo 15% de soro ósseo fetal (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina e estreptomicina, a 37 °C em uma incubadora de 5% de CO₂. Na Figura 36 pode-se observar o esquema ilustrativo da cultura de células.

Figura 36 - Esquema ilustrativo do fluxo de trabalho de cultivo das células hBMSCs.



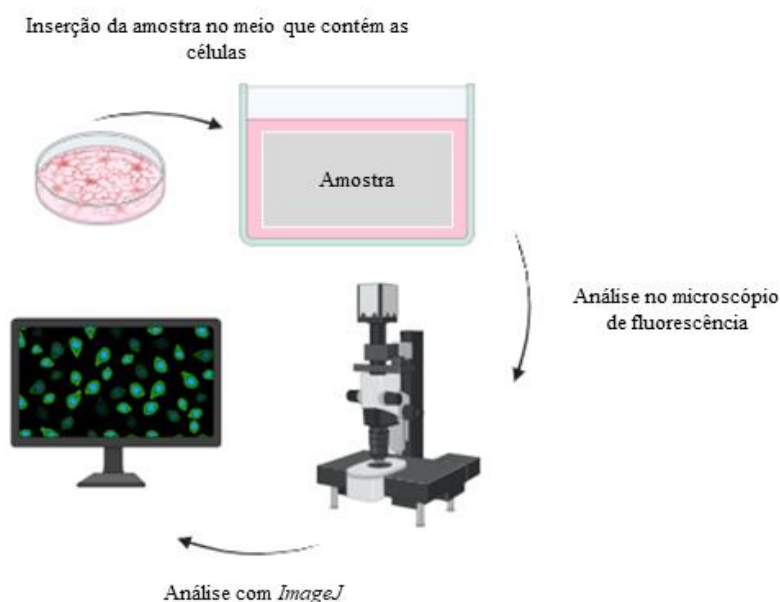
Fonte: Autoria própria (2024). Criado em BioRender.

Antes de semear as células na superfície dos discos de titânio, estes últimos foram esterilizados sob luz ultravioleta por 60 min, cada lado. Então, os discos de titânio foram colocados em poços individuais em uma placa contendo 24 poços.

4.2.4.3 Ensaio de adesão

Uma suspensão de células (200 μ l) contendo 2×10^4 células foi adicionada aos poços contendo os discos. Após incubação por 1h, as células aderidas à superfície dos discos foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) e os núcleos foram corados com Hoechst-33342. Os núcleos corados foram fotografados usando um microscópio de fluorescência (Evident IX83, Tóquio, Japão) e contados usando o *software* ImageJ. Pelo menos 4 áreas aleatórias por amostra foram fotografadas para a análise. Pode-se observar na Figura 37 o esquema do ensaio de adesão.

Figura 37 - Ensaio de adesão das amostras na liga de titânio Ti15Zr15Mo.



Fonte: Autoria própria (2024). Criado em Biorender.

4.2.4.4 Viabilidade celular

Antes do ensaio, uma suspensão de células (50 μ l) contendo 2×10^4 células foi pingada nos discos e, após 1 hora, 1 mL de meio basal foi adicionado aos poços contendo os discos. As células foram cultivadas por 1 e 7 dias. O meio foi trocado duas vezes por semana.

Para análise de viabilidade, hBMSCs foram incubadas em meio basal fresco contendo 10% de reagente azul de AlamarBlue® (Thermo Fisher Scientific), por 2 horas a 37 °C, em uma incubadora de 5% de CO₂. Posteriormente, 100 μ l do meio foi aliqotado em poços individuais de uma placa de 96 poços e a densidade óptica da solução foi medida a 570 nm,

usando um espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific). Os valores foram normalizados para a liga de titânio sem tratamento de superfície (Grupo 1 - Controle - TZM).

4.2.4.5 Ensaio de células vivas/mortas

Antes do ensaio, 50 μ l de suspensão de células, contendo 1×10^4 células, foi colocada nos discos e, após 1 hora, 1 mL de meio basal foi adicionado aos poços contendo os discos. As células foram cultivadas por 1 e 7 dias antes da análise. O meio foi trocado duas vezes por semana.

Para a análise das células vivas/mortas, hBMSCs foram incubadas em meio basal fresco contendo calceína-AM (0,002 mM), iodeto de propídio (0,003 mM) e Hoechst (2 μ g/mL) por 0,5 hora, a 37 °C, em uma incubadora de 5% de CO₂. Então, os discos foram transferidos para um novo poço contendo meio basal e observados sob um microscópio fluorescente (Evident IX83).

4.2.4.6 Teste de citotoxicidade

Antes do ensaio, uma suspensão de células (50 μ l) contendo 2×10^4 células foi colocada nos discos e, após 1 hora, 1 mL de meio basal foi adicionado aos poços contendo os discos. As células foram cultivadas por 1 e 4 dias antes da análise.

Para análise da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada de células danificadas, o sobrenadante foi coletado após hBMSCs serem cultivadas por 1 ou 4 dias nos discos. Posteriormente, 100 μ l do sobrenadante foi aliqotado em poços individuais de uma placa de 96 poços, misturado com uma quantidade igual da solução de trabalho do Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo). Então, a densidade óptica da solução foi medida a 490 nm, usando um espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific). Os valores foram normalizados para a liga de titânio sem tratamento de superfície (Grupo 1 - Controle - TZM).

4.2.4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal

Para caracterizar a morfologia celular após a semeadura nos discos por 1 e 7 dias, as células foram fixadas com 4% de PFA e desidratadas por meio de uma série graduada de etanol e butanol, e liofilizadas. Antes da observação, as células foram revestidas com ósmio.

O equipamento utilizado para a microscopia eletrônica de varredura foi MEV (S-4800; Hitachi, Tóquio, Japão) equipado com um espectroscópio de raios X de energia dispersiva (EDS), do Laboratório Central de Pesquisa, Faculdade de Medicina da Universidade de Okayama (Japão).

Como alternativa, as células foram coradas com Phalloidin-AlexaFluor594 (Sigma-Aldrich) para corar fibras de F-actina, por pelo menos 24 horas a 4°C. Após a incubação com o corante, as células foram lavadas com solução salina tampão fosfato e observadas usando um microscópio confocal de varredura a laser (LSM780; Carls Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1

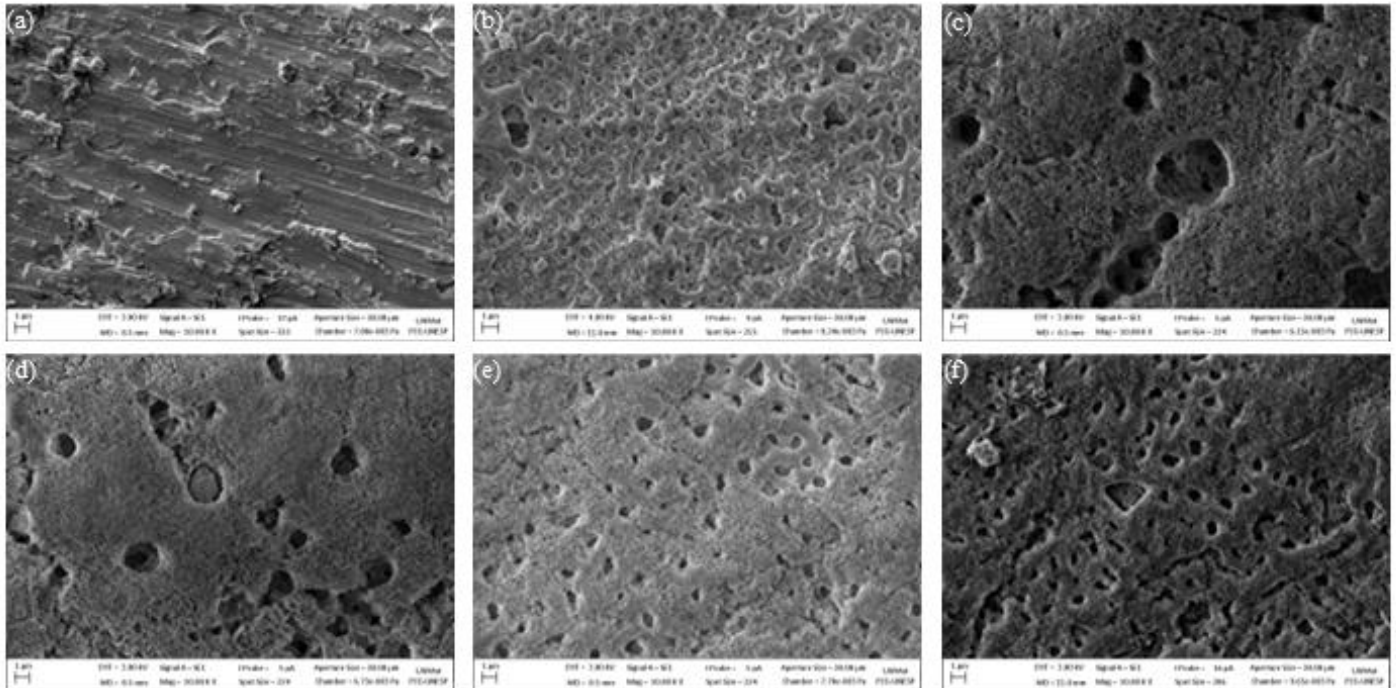
Para este estudo foram considerados 6 grupos, conforme mencionado nos materiais e métodos, no qual tem o grupo controle (G1 – TZM), amostra após tratamento de superfície PEO sem Sr (G2 – TZM PEO), amostra após tratamento de superfície PEO sem Sr seguida de calcinação (G3 – TZM PEO Calcinado) e amostra após tratamento de superfície PEO com 0,07 M de Sr seguida por calcinação (G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado).

5.1.1 Caracterização da superfície da liga Ti15Zr15Mo

5.1.1.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva

Na Figura 38 estão apresentadas as micrografias resultantes da microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada na superfície da liga experimental de Ti15Zr15Mo após oxidação por plasma eletrolítico.

Figura 38 - Micrografias da superfície da liga Ti15Zr15Mo antes e após oxidação por plasma eletrolítico em eletrólito formado por 0,2 mol/L de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0,1 mol/L de NaH_2PO_4 e variou-se a concentração de $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO 0,01 M Sr (G3), (d) TZM PEO 0,04 M Sr (G4), (e) TZM PEO 0,07 M Sr (G5) e (f) TZM PEO 0,1 M Sr (G6), com ampliação de 10kx.



Fonte: Autoria própria (2024).

O processo de oxidação por plasma eletrolítico gerou uma camada porosa, como pode-se observar nas micrografias (Figura 38), característica típica deste tratamento de modificação da superfície (KOSTELAC et al., 2022; THUKKARAM et al., 2020). Essas imagens corroboram com resultados de Zhang et al. (2022), que estudaram a liga Ti6Al4V nas mesmas condições da PEO. Os autores prepararam revestimentos de hidroxiapatita dopados com Sr na superfície da liga Ti6Al4V utilizando a técnica PEO, alterando a concentração de $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ no eletrólito e estudando os efeitos da adição de Sr, analisando a microestrutura e a bioatividade das camadas geradas pelo tratamento de superfície.

Este resultado é considerado adequado porque superfícies porosas melhoram a bioatividade dos implantes e induzem a osseointegração (KIRMANIDOU et al., 2016). Além disso, superfícies com maior área específica e com poros tendem a diminuir a adesão bacteriana (LI et al., 2013). Segundo Wang et al. (2015), uma área específica de superfície relativamente maior pode promover uma quantidade maior de pontos de ligação entre as células e o osso, favorecendo o crescimento celular. Implantes sem porosidade possuem limitações ao induzir regeneração óssea e a fixação do implante (YILMAZ et al., 2018). Esse problema pode ser superado imitando as propriedades físicas (30 - 95% porosidade) e

mecânicas (2,3 a 30 GPa módulo de elasticidade) do osso para produção do implante (RAO; CHU; ZHENG, 2014).

A maioria dos revestimentos resultantes da oxidação por plasma eletrolítico são altamente porosas, com níveis em geral ~10–20 % para todos os substratos, e complexa arquitetura, cobrindo uma ampla gama de escalas (CURRAN; CLYNE, 2006; ZHANG et al., 2016). As razões para o nível e a natureza da porosidade estão relacionadas à maneira que as descargas se formam e com os parâmetros da PEO (KOSTELAC et al., 2022). No entanto, existem esforços contínuos para reduzir estes níveis ou ao menos para tornar a porosidade mais fina e mais uniforme (WANG et al., 2015). De forma geral, a presença de porosidade no revestimento da PEO é benéfica em diversos casos, principalmente em aplicações no qual uma grande área de superfície específica é necessária, como para fins biomédicos (CLYNE; TROUGHTON, 2019). Essa vantagem se dá porque há estudos de que as superfícies nano ou micro estruturadas em implantes não apenas se assemelham à morfologia estrutural dos constituintes dos tecidos ósseos, mas também à estrutura de proteínas do corpo humano (SOWMYA et al., 2013). Este tipo de topografia da superfície é interessante pois imita a estrutura hierárquica do tecido ósseo (FENG et al., 2002), podendo melhorar suas propriedades biológicas e resposta celular (LIU; CHU; DING, 2010). Estas são a soma da habilidade da célula aderir, migrar, proliferar e se diferenciar, segundo Wen et al. (2015).

Além disso, existem benefícios de estabilidade mecânica que surgem dos efeitos da porosidade, incluindo microfissuras, em um revestimento da PEO na redução de sua rigidez (DEAN; GU; CLYNE, 2015). De acordo com Clyne; Troughton (2019), esta redução aumenta consideravelmente a tolerância à deformação do revestimento. Por exemplo, reduz o estresse proveniente da deformação do componente.

A partir das micrografias, pode-se observar que o Grupo TZM PEO (G2 - Figura 38b), o Grupo TZM PEO 0,07 M Sr (G5 - Figura 38e) e o Grupo TZM PEO 0,1 M Sr (G6 - Figura 38f) apresentam maior quantidade de poros e a camada formada é mais uniformemente distribuída quando comparada ao Grupo TZM PEO 0,01 M Sr (G3 - Figura 38c) e ao Grupo TZM PEO 0,04 M Sr (G4 - Figura 38d). Ao analisar os grupos G2, G5 e G6, pode-se afirmar ainda que o grupo G5, no qual a PEO foi realizada com a concentração de 0,07 M de acetato de estrôncio, apresentou uma camada mais homogênea e com os poros de tamanho semelhante, bem separados uns dos outros, distribuídos por toda a superfície da amostra. As estruturas porosas uniformes formadas na superfície da liga Ti15Zr15Mo têm um resultado mais interessante para aplicação biomédica porque teoricamente promovem maior adesão e

espalhamento dos osteoblastos, beneficiando o crescimento do tecido ósseo e melhorando a integração do implante com o tecido ósseo (WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2022).

Conforme publicações na literatura (AI et al., 2021; ZOU et al., 2021, 2022), ainda não se pode afirmar como o tamanho dos poros afeta o crescimento ósseo, portanto, este trabalho focou em analisar a superfície após a modificação da superfície como um todo e não em relação ao tamanho dos poros produzidos pela oxidação por plasma eletrolítico. Diversos estudos foram conduzidos em implantes de titânio para observar a resposta celular e a osseointegração em superfícies com diferentes tamanhos de poros e porosidades, e os resultados ainda são inconsistentes (ZHANG et al., 2022). De maneira geral, sabe-se que os principais fatores que afetam a formação óssea são o formato dos poros, sua distribuição ao longo da superfície e a estrutura interna do osso (CHEN et al., 2020; WANG et al., 2022).

A partir dos resultados obtidos na EDS (Tabela 1), pode-se observar que em todos os grupos após PEO há presença dos elementos Ca e P. Assim como os grupos no qual foi utilizado acetato de estrôncio no eletrólito, há presença de Sr. Isso indica que houve deposição durante o tratamento de superfície, que é um dos propósitos da PEO (WANG et al., 2022). O elemento Al apareceu na maioria dos grupos, a hipótese é que seja proveniente de contaminação por impurezas durante a etapa de processamento da liga. Já os elementos C e O são do eletrólito.

Tabela 1 - Concentração atômica em porcentagem da superfície das amostras de Ti15Zr15Mo antes e após tratamento de oxidação por plasma eletrolítico, analisado por EDS.

Grupo	Ti	Zr	Mo	Ca	P	Sr	Na	Al	C	O
G1 – TZM	70,24	14,38	15,38	-	-	-	-	-	-	-
G2 – TZM PEO	41,57	8,24	5,18	2,24	0,68	-	-	0,11	4,48	37,50
G3 – TZM PEO 0,01 M Sr	61,70	13,10	7,80	9,20	6,40	1,00	-	0,80	-	-
G4 – TZM PEO 0,04 M Sr	48,60	9,80	5,70	17,90	12,10	5,40	-	0,50	-	-
G5 – TZM PEO 0,07 M Sr	60,30	13,40	6,80	7,40	5,80	5,10	0,40	0,80	-	-
G6 – TZM PEO 0,1 M Sr	36,40	6,50	3,50	23,00	16,30	13,90	0,40	-	-	-

Fonte: Autoria própria (2024).

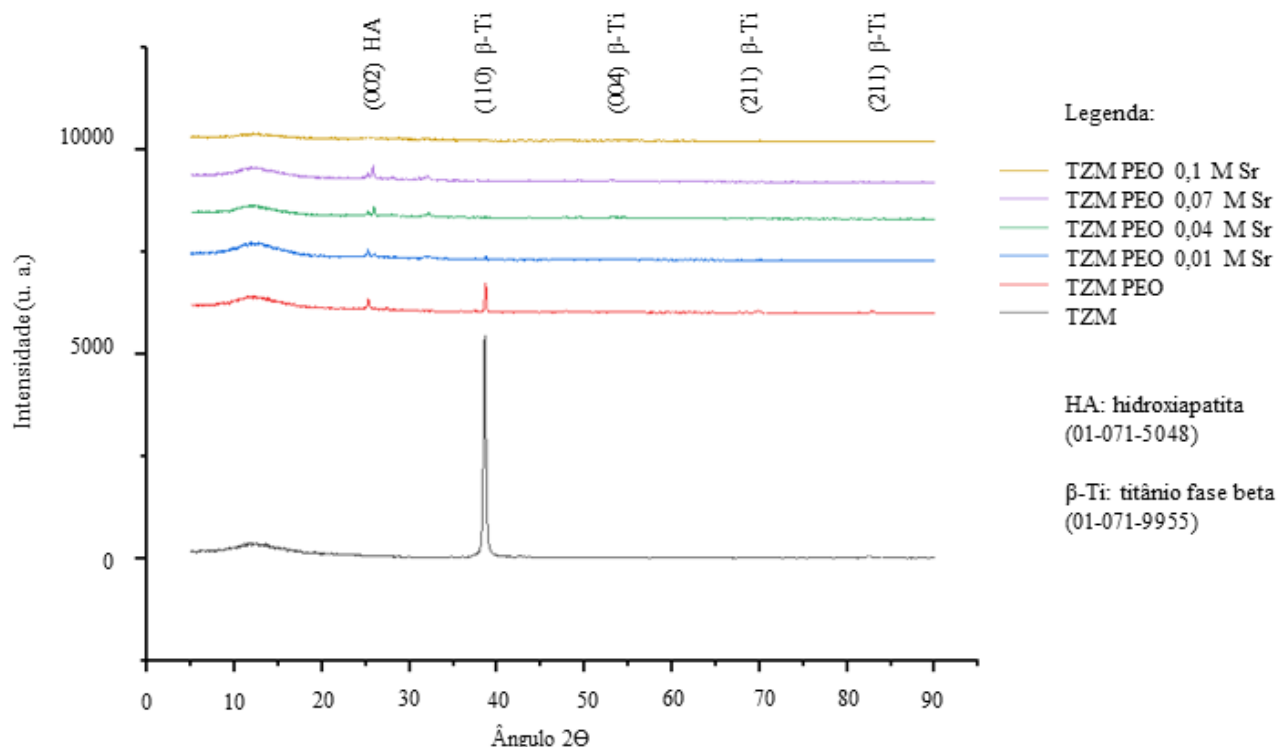
Além disso, foi calculada a relação entre Ca e P pela fórmula Ca/P, com os valores dos elementos obtidos na EDS para cada grupo e encontrou-se: 1,23 (G2); 1,43 (G3); 1,44 (G4); 1,27 (G5); 1,41 (G6). Todas as relações dos revestimentos formados no substrato foram menores do que 1,67, que é a proporção de Ca e P da hidroxiapatita. Segundo Avci et al. (2017), esse resultado sugere que a camada gerada é deficiente em Ca, principalmente devido à incorporação de Sr. Conforme reportado anteriormente, o elemento Ca penetra no

revestimento com mais facilidade do que o Sr sob as mesmas condições de processamento (NAN et al., 2009). Apesar disso, estudos concluíram que Ca/P menores que 2 otimizaram a viabilidades dos osteoblastos e promoveram atividade alcalina fosfatase após 72 h de cultura celular (LIU et al., 2008). Mesmo com a razão entre Ca e P da hidroxiapatita sendo considerada na literatura como 1,67, a análise EDS pode fornecer informação sobre as porcentagens atômicas destes elementos na camada da superfície, mas não tem como concluir ao certo se esses eles estão presentes como HA ou em outras fases diferentes (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014).

5.1.1.2 Difração de raios X

Na Figura 39 pode-se observar os difratogramas obtidos dos 6 grupos de estudo no Experimento 1. Eles mostram o predomínio da fase β , confirmado pelo padrão de fase beta do titânio (PDF 44-1288) e planos de difração (110), (004) e (211). Além disso, os picos observados na amostra estão associados a picos presentes em ligas de titânio relatados por outros autores (SCHMIDT et al., 2016).

Figura 39 - Difratogramas da superfície das amostras da liga TZM, conforme os grupos que constam na legenda.



Fonte: Autoria própria (2024).

Nos grupos após a modificação da superfície PEO observa-se a presença de um pico de hidroxiapatita em torno de 26° , que indica uma orientação (002) dos cristais de HA depositados no substrato metálico (SCHMIDT et al., 2016). Os padrões revelam uma mudança dos picos de difração da fase apatita para ângulos de difração menores com o aumento da concentração de estrôncio no eletrólito da PEO. Isso pode indicar a incorporação ou a substituição completa de Sr na fase da HA, em que íons Sr maiores nos sítios de Ca causam uma expansão da estrutura hexagonal e, portanto, um aumento no parâmetro de rede (SCHMIDT et al., 2020).

A análise de DRX revela a composição de fase, mas sua quantificação é problemática, mesmo se o método Rietveld ou outro similar é utilizado. Em geral, a aquisição de informação quantitativa da DRX é mais difícil para análise de superfície do que para pós, pois a primeira geralmente está disponível apenas em quantidades limitadas. Como resultado, a intensidade de raios X é substancialmente reduzida e o refinamento torna-se menos confiável. Enquanto para o volume do material, pode-se assumir que as células unitárias constituintes são repetidas periodicamente no espaço e, portanto, formatos lineares são controlados pela sobreposição dos picos em diferentes reflexões. No caso das camadas da superfície, particularmente quando grandes fases amorfas estão presentes, ocorrem desvios muito significativos em relação à perfeita periodicidade. Por essas razões, muitas investigações se limitam a comparar aproximadamente em termos de maior ou menor quantidade de hidroxiapatita em suas amostras (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014).

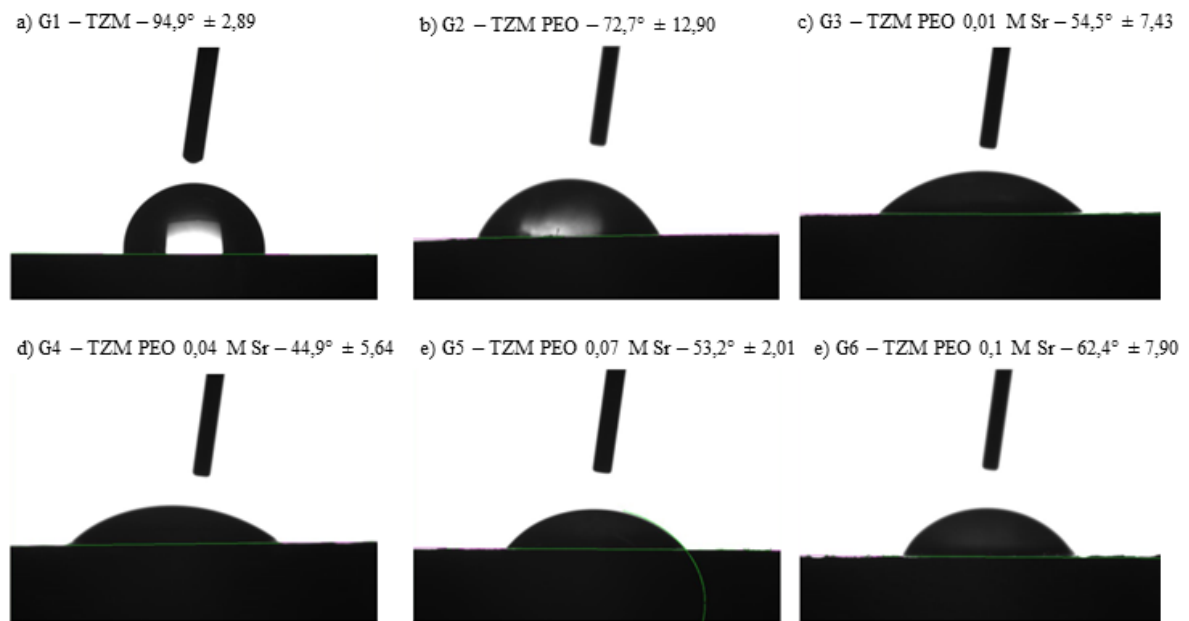
5.1.1.3 Molhabilidade

Com o objetivo de verificar a molhabilidade e em qual condição é mais adequada para aplicação biomédica da liga TZM. Esta caracterização da superfície de um material pode ser obtida pelo ângulo de contato entre a interface da gotícula e a superfície horizontal. Quando este ângulo é maior do que 90° , a superfície é hidrofóbica e quando o ângulo de contato é menor do que 90° , a superfície é hidrofílica. A molhabilidade da superfície afeta a interação entre o material e o meio biológico, portanto, superfícies altamente hidrofílicas (superhidrofílica, ângulo de contato $< 10^\circ$) tem interações melhores com o meio biológico e com as células quando comparadas às superfícies altamente hidrofóbicas (superhidrofóbica, ângulo de contato $> 150^\circ$). Assim, quando há umedecimento completo, indica que há

biocompatibilidade, hidrofiliçidade e alta energia de superfície (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018).

A partir da Figura 40 pode-se observar o ângulo de contato da amostra lixada (grupo controle) e dos grupos após modificação da superfície PEO.

Figura 40 - Resultados obtidos na análise do ângulo de contato, por meio do método de gota sêssil, considerando os meios ar, água e superfície da liga Ti15Zr15Mo: (a) G1 – TZM; (b) G2 – TZM PEO; (c) G3 – TZM PEO 0,01 M Sr; (d) G4 – TZM PEO 0,04 M Sr; (e) G5 – TZM PEO 0,07 M Sr; (f) G6 – TZM PEO 0,1 M Sr.



Fonte: Autoria própria (2024).

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que o ângulo de contato na superfície lixada é maior que 90° (G1 - Figura 40a), sendo hidrofóbico, enquanto o ângulo das demais caracteriza hidrofiliçidade por ser menor que 90°. Os grupos 4, 5 e 3 (Figura 40d, Figura 40e, Figura 40c) são os que resultaram em um ângulo de contato menor: 44,9° (G4), 52,3° (G5) e 54,5° (G3), respectivamente do menor para o maior.

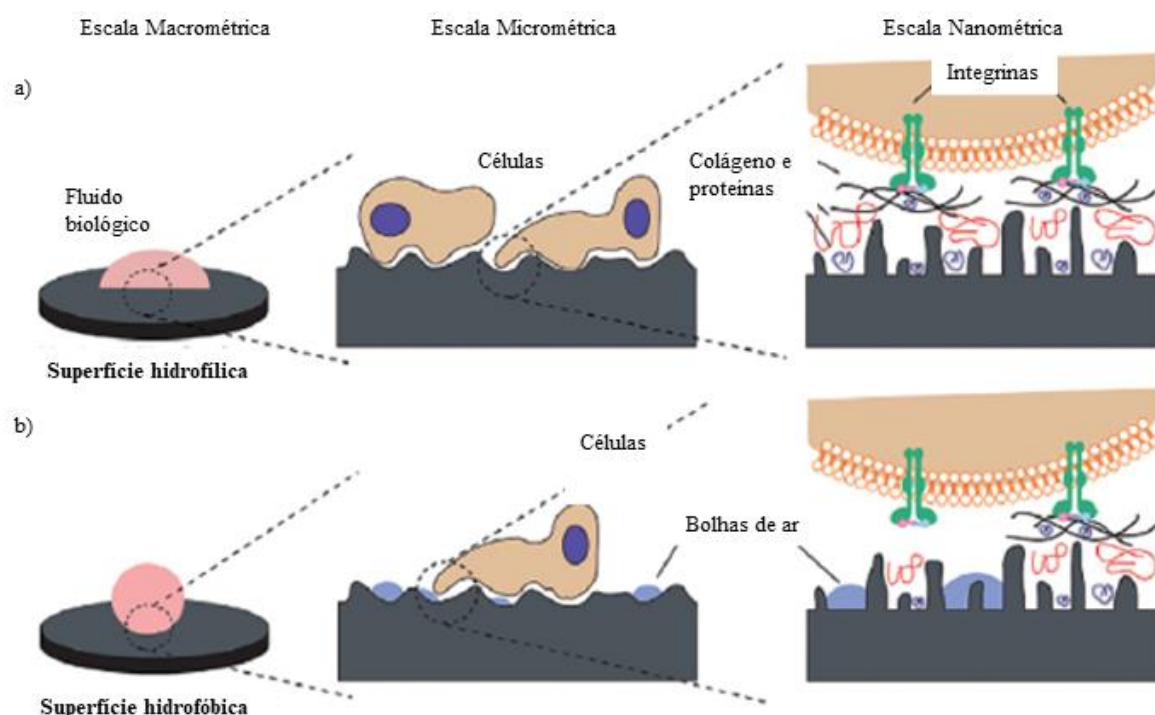
O ângulo de contato é um indicativo do espalhamento de um fluido sobre uma superfície e quanto menor esse valor, maior é caráter hidrofílico da superfície. A análise da molhabilidade por meio da medida do ângulo de contato pode ser influenciada pela heterogeneidade topográfica da superfície, além de medir apenas um tipo de interação, polar ou apolar (CAROBOLANTE, 2017). A molhabilidade da superfície é um dos parâmetros mais importantes que afetam a resposta biológica em um biomaterial implantado e deve ser considerada a micro e nanoescala. Ela afeta adsorção de proteína, coagulação sanguínea,

adesão de bactéria e, segundo estudos, é reduzida em superfícies microestruturadas (ESCADA; NAKAZATO; CLARO, 2017).

Ademais, a molhabilidade da superfície de um implante é importante na bioatividade e na adesão celular, sendo que sua diminuição é mais favorável a estas propriedades (AGILAN; RAJENDRAN, 2018). Além disso, a hidrofilicidade do material induz o contato com os fluidos corpóreos, que resulta em desenvolvimento celular (RUPP et al., 2006). Assim, segundo Escada et al. (2017), superfícies altamente hidrofílicas são mais desejáveis que as hidrofóbicas devido às suas interações com fluidos biológicos, células e tecidos. Por isso, para promover proliferação de osteoblastos humanos, é necessário aumentar a área de superfície do implante, que consequentemente aumenta a molhabilidade da superfície. Como atualmente a maioria dos implantes utilizados clinicamente são hidrofóbicos (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018), o tratamento de superfície melhorou esta condição para a liga Ti15Zr15Mo.

Para que fique mais fácil de visualizar como funciona a molhabilidade quando há interação com os fluidos biológicos, pode-se observar na Figura 41 os esquemas da superfície hidrofílica (Figura 41a) e da superfície hidrofóbica (Figura 41b). Na Figura 41a, há adsorção de proteínas pela superfície após interações com receptores celulares. A partir da Figura 41b, pode-se reparar que a superfície hidrofóbica é mais suscetível à contaminação por hidrocarbonetos, gerando bolhas que podem impedir a adsorção de proteínas e a adesão e ativação das células receptoras. A contaminação é a razão principal pela qual a superfície hidrofílica é mais interessante que a superfície hidrofóbica para aplicações biomédicas (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018; RUPP et al., 2006).

Figura 41 - Esquema de possíveis interações (a) hidrofílicas e (b) hidrofóbicas, em macro, micro e nanoescala.



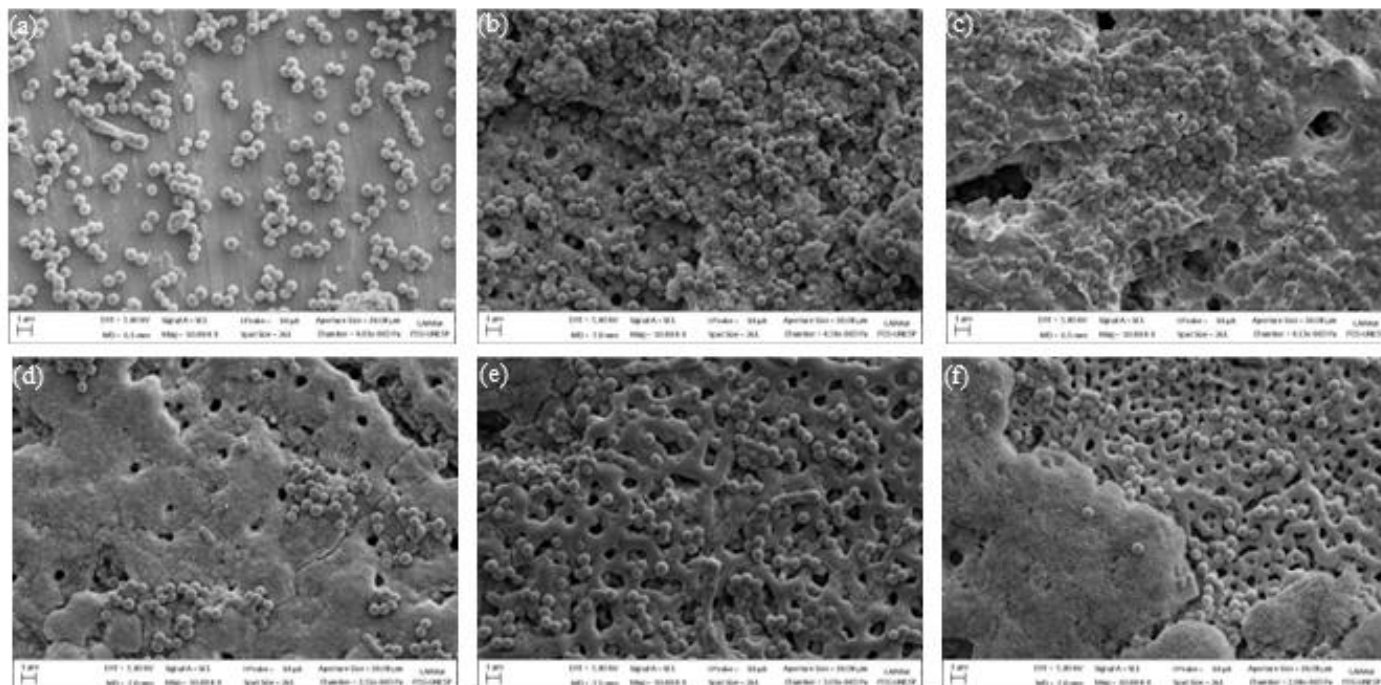
Fonte: adaptado de Rasouli, Barhoum, Uludag (2018).

5.1.2 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo

5.1.2.1 Análise da atividade microbiológica

Na Figura 42 pode-se observar as micrografias obtidas após ensaios da atividade microbiológica e na Figura 43 contém a análise estatística dos grupos controle (G1), liga Ti15Zr15Mo após PEO (G2), liga TZM após PEO 0,01 M Sr (G3), liga TZM após PEO 0,04 M Sr (G4) liga TZM após PEO 0,07 M Sr (G5) e liga TZM após PEO 0,1M Sr (G6). A partir das imagens pode-se afirmar que a bactéria *S. aureus* é redonda, conforme informações da literatura (MADRUGA et al., 2021b). Além disso, a Figura 42a e a Figura 42b apresentam um número maior de bactérias, quando se compara com os demais grupos. Nos grupos após modificação de superfície por PEO com Sr, pode-se notar algumas bactérias aglomeradas, porém é necessária uma análise estatística de uma área maior da superfície das amostras para complementar a discussão.

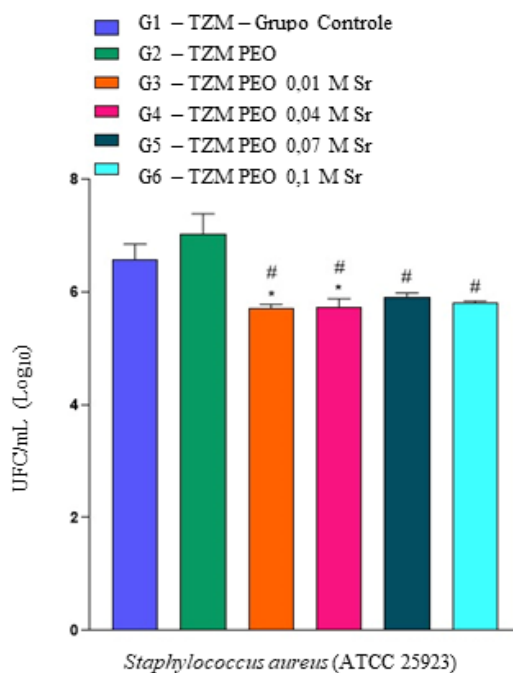
Figura 42 - Análise da atividade microbiológica por meio de caracterização por MEV, com ampliação de 10 kx. Os grupos de estudo são: (a) TZM (G1); (b) TZM PEO (G2); (c) TZM PEO 0,01 M Sr (G3); (d) TZM PEO 0,04 M Sr (G4); (e) TZM PEO 0,07 M Sr (G5) e (f) TZM PEO 0,1 M Sr (G6).



Fonte: Autoria própria (2024).

As informações do gráfico da Figura 43 indicam que há maior atividade microbiológica nos grupos 1 e 2 (TZM e TZM PEO), quando comparados aos demais. Isso confirma que o tratamento PEO com estrôncio em seu eletrólito (G3, G4, G5 e G6) é mais atrativo para aplicações biomédicas, pois possuem menor quantidade de formação de colônias de bactérias em sua superfície, de acordo com a literatura (ZHOU; WANG; ZHAO, 2019). Tal característica demonstra um efeito bactericida dos grupos com adição de acetato de estrôncio maior em relação aos grupos G1 e G2. Porém, quando os grupos com Sr são comparados, não há diferença significativa, assim são semelhantes ao se analisar estatisticamente. Segundo Podporska-Carroll et al. (2015), os agentes bactericidas na forma de partículas de óxidos podem levar à morte das bactérias por contato ou liberação dos elementos, resultante de processos químicos.

Figura 43 - Análise estatística da atividade microbiológica das amostras da liga Ti15Zr15Mo, conforme os grupos na legenda apresentada.



Fonte: Autoria própria (2024).

A influência de agentes bactericidas, como o estrôncio, tem sido estudada e uma das maiores preocupações é como o revestimento PEO pode prevenir a citotoxicidade causada pela liberação de íons metálicos. Com isso, é importante ajustar os parâmetros da PEO de maneira a balancear a eficiência bactericida com a viabilidade celular (ZHAO et al., 2020). Assim, o ajuste da quantidade de estrôncio no eletrólito pode controlar essa liberação de íons e evitar toxicidade (NIKOOMANZARI et al., 2022). Dessa maneira, é fundamental complementar a análise da atividade microbiológica com outros ensaios biológicos.

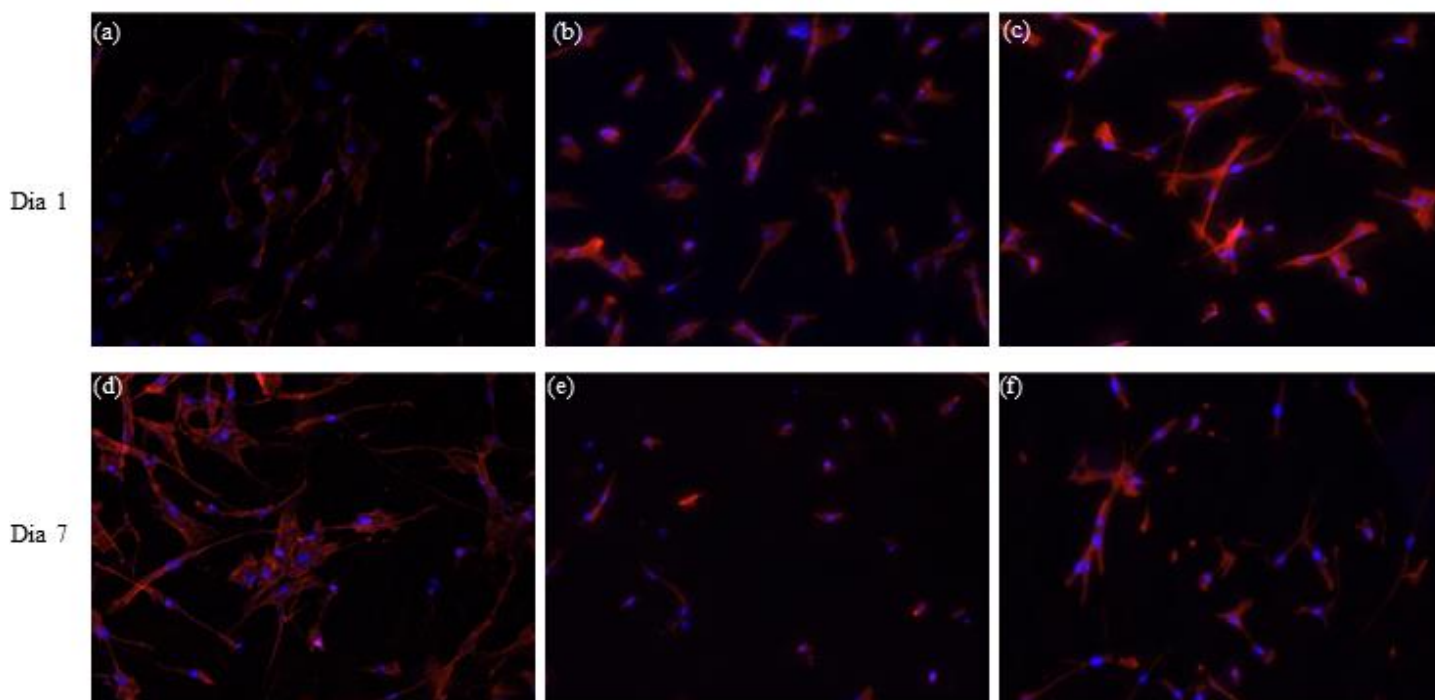
5.1.2.2 Ensaios *in vitro*

Os estudos *in vitro* foram realizados após a escolha da molaridade do estrôncio utilizado no eletrólito da PEO (0,07 M), com base na caracterização das superfícies e da atividade microbiológica. Ao analisar os resultados da MEV, EDS, molhabilidade, DRX e atividade microbiológica, a condição escolhida dentre os grupos de PEO com estrôncio no eletrólito foi 0,07 M de Sr, porque apresentou superfície com poros mais distribuídos ao longo da amostra e mais homogênea em relação aos demais grupos com Sr. As outras caracterizações apresentaram resultados semelhantes entre os grupos com estrôncio. Assim,

nos ensaios *in vitro* foram avaliados três grupos: TZM (G1 – Grupo controle), TZM PEO (G2) e TZM PEO 0,07 M Sr (G3).

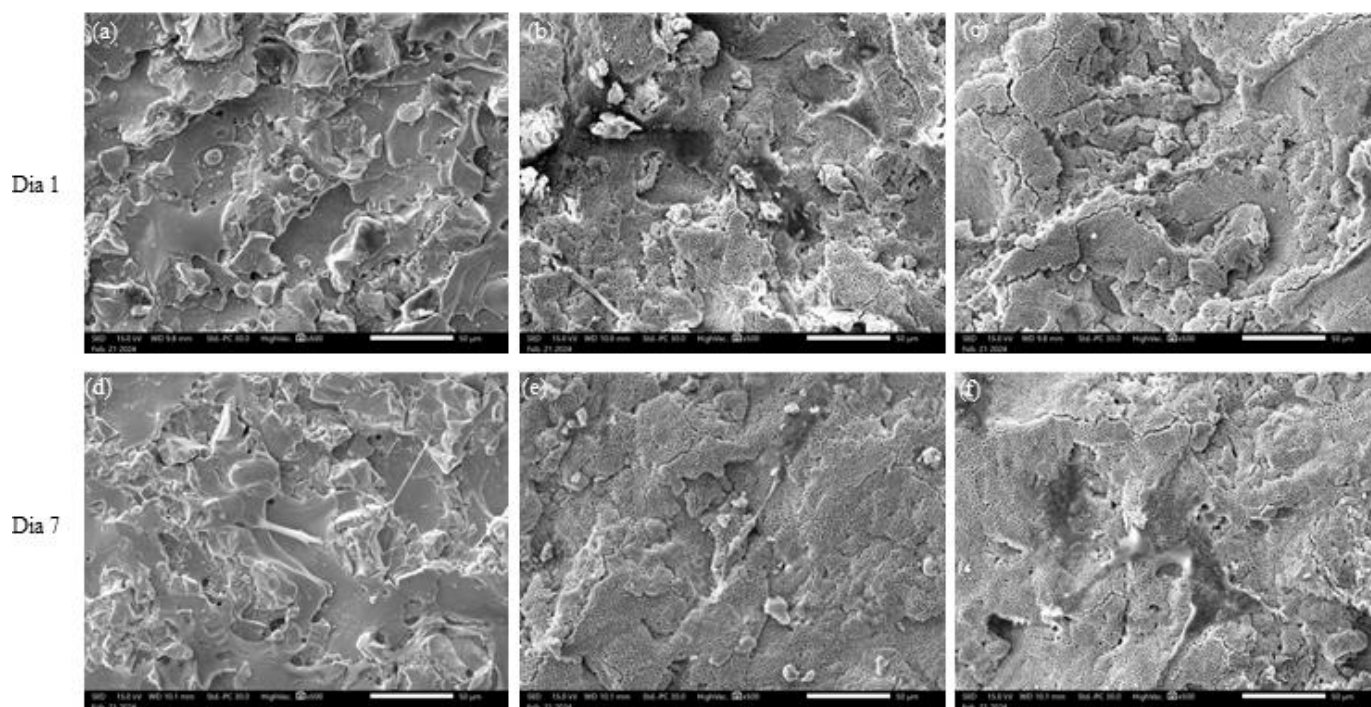
Na Figura 44 estão apresentadas as imagens resultantes da análise da imunofluorescência após Dia 1 e Dia 7. É possível observar que após 24 h houve adesão celular em todas as superfícies. No entanto, após o Dia 7, para as amostras da PEO houve morte celular, com uma diminuição significativa de células aderidas, ou seja, não ocorreu a proliferação celular. A morfologia das células pode ser observada nas imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura para o Dia 1 e Dia 7 (Figura 45). Apesar da literatura constar estudos no qual Sr incorporado em CaP na superfície de ligas metálicas apresentar proliferação celular (KURODA et al., 2008; LIU et al., 2008; DANCIU et al., 2003), no nosso trabalho as células morreram depois de 24 h. Zhou et al. (2019) avaliaram discos de titânio com micros poros de TiO₂ dopados com íons de Sr por meio da PEO e obtiveram resultados interessantes de que houve proliferação celular e osteogênese relacionada à adição de estrôncio nas amostras (ZHOU; WANG; ZHAO, 2019). Uma hipótese para melhorar esta característica pode ser testar outras concentrações de Sr durante a PEO ou realizar tratamento térmico após a PEO (BORCIANI et al., 2022).

Figura 44 - Imagens de microscopia de fluorescência das células adiposas coradas com DAPI e Faloidina/Rodamina. Dia 1: (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO 0,07 M Sr (G3). Dia 7: (d) TZM (G1), (e) TZM PEO (G2), (f) TZM PEO 0,07 M Sr (G3).



Fonte: Autoria própria (2024).

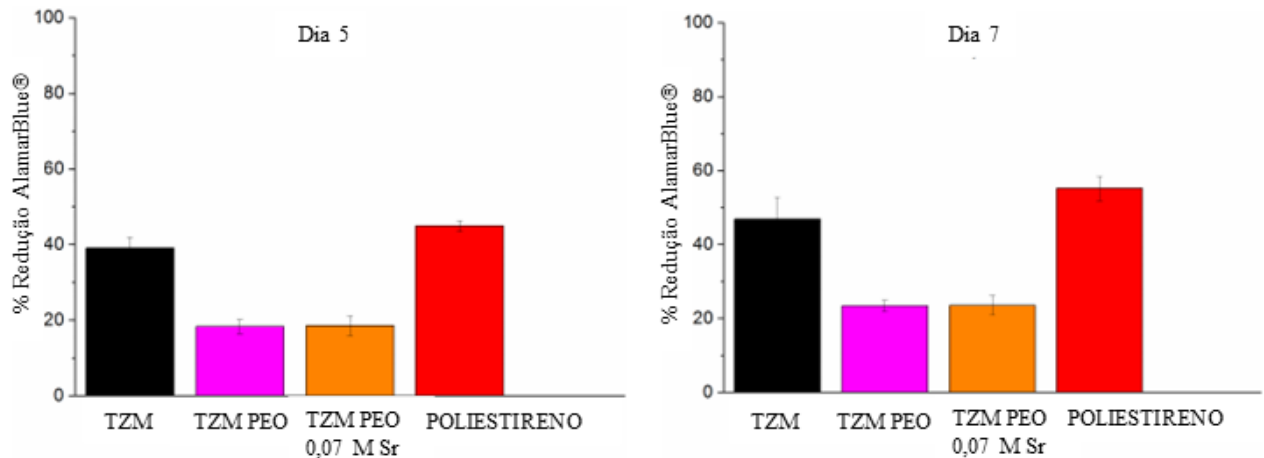
Figura 45 - Micrografias MEV mostrando a morfologia das células após 24h de cultura celular: (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO 0,07 M Sr (G3), com ampliação de 15 kx.



Fonte: Autoria própria (2024).

Os resultados obtidos no teste AlamarBlue® mostraram que as células proliferaram em todas as superfícies, como pode-se observar na Figura 46. A proliferação celular e a adesão inicial das células na superfície do biomaterial são cruciais porque influenciam a diferenciação osteogênica e, consequentemente, na estabilidade do implante a longo prazo (SOUZA et al., 2020). Com isso, os melhores resultados foram verificados no grupo controle (G1 – TZM), com uma redução na proliferação celular nas amostras que foram tratadas com PEO. Quando compara-se o Dia 5 e o Dia 7, nota-se que mantém a tendência e que os grupos após PEO não têm diferença estatisticamente. O poliestireno foi utilizado como controle para calcular a porcentagem de redução do AlamarBlue®.

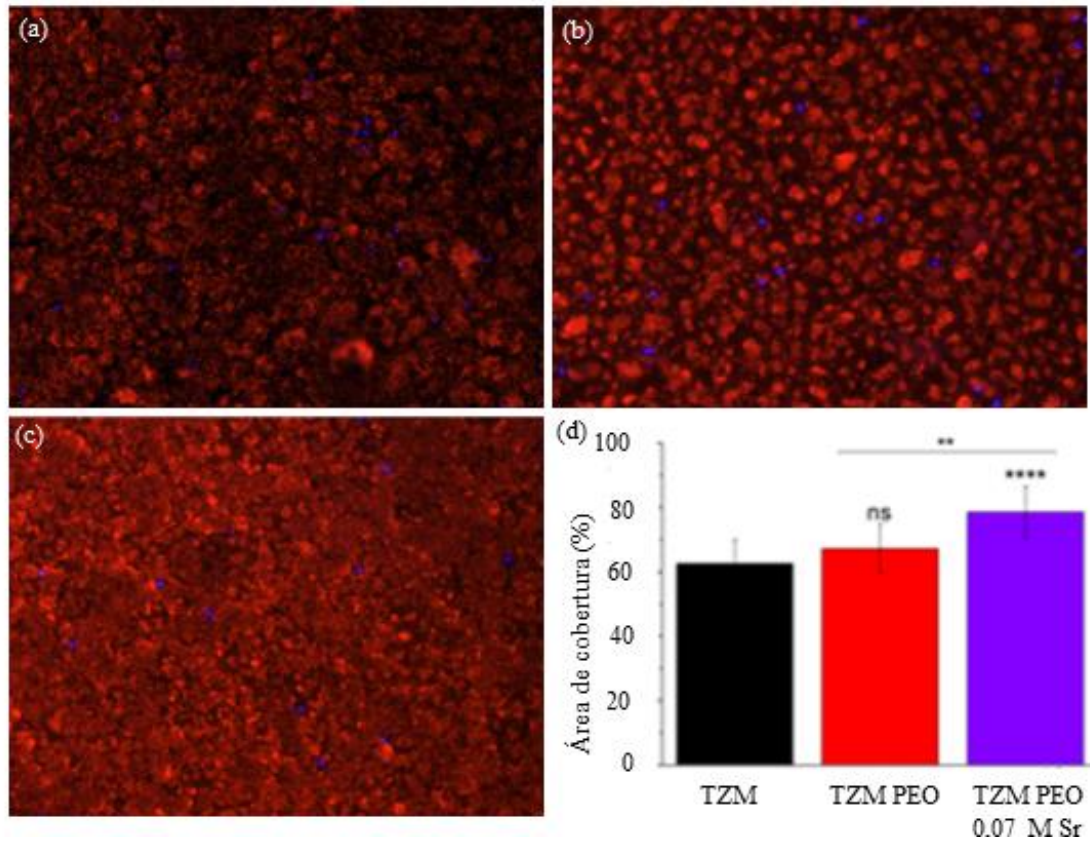
Figura 46 - Resultados da proliferação celular determinada por AlamarBlue® após 5 e 7 dias de incubação.



Fonte: Autoria própria (2024).

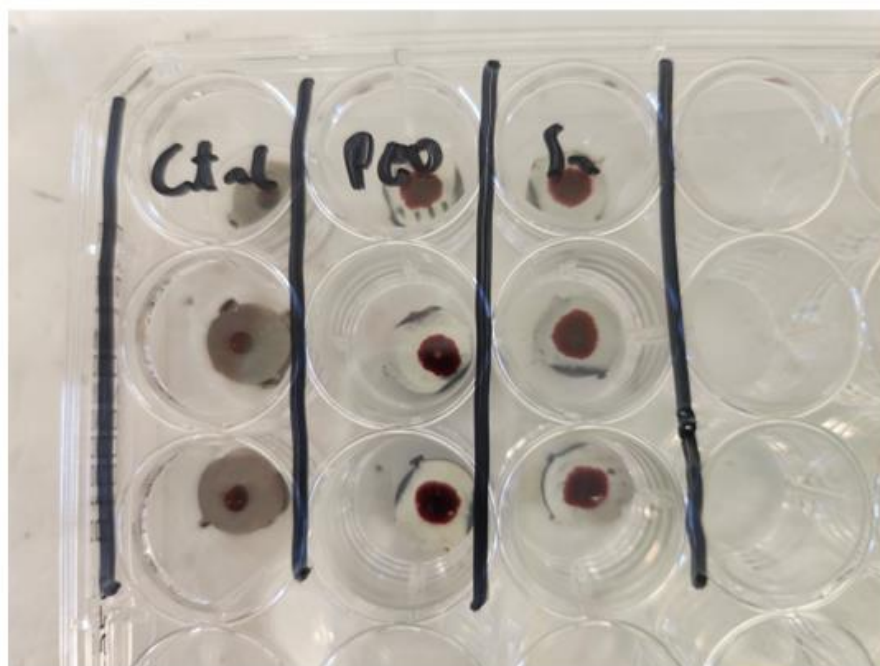
A análise da adesão das plaquetas na superfície da liga Ti15Zr15Mo para as diferentes superfícies estudadas pode ser observada na Figura 47, no qual a adesão de plaquetas está em vermelho. A adsorção de proteínas é considerada o evento inicial na coagulação e este evento está diretamente relacionado com a energia de superfície. A adesão das plaquetas na superfície dos biomateriais é um indicador de trombogenicidade e atividade pró-coagulante, levando à ativação das plaquetas, que pode iniciar a coagulação (HEDAYATI et al., 2019). Na Figura 48 é possível observar a superfície das amostras após o ensaio de hemocompatibilidade, sendo considerados os mesmos grupos: (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2) e (c) TZM PEO 0,07 M Sr (G3). Dessa maneira, foi possível verificar que nas amostras tratadas em PEO com eletrólito contendo estrôncio (Grupo 3 –TZM PEO 0,07 M Sr), houve uma maior área de coagulação (Figura 46d) e que pode ser observado visualmente nas amostras, quando comparado ao grupo controle (Figura 48).

Figura 47 - Superfície das amostras após ensaio de hemocompatibilidade: (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO 0,07 M Sr (G3) e (d) Porcentagem da área de cobertura das plaquetas na superfície das amostras de cada grupo.



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 48 - Aspecto da superfície das amostras mostrando a coagulação da superfície, sendo Ctrl o Grupo 1 (TZM), PEO o Grupo 2 (TZM PEO) e Sr o Grupo 3 (TZM PEO 0,07 M Sr).



Fonte: Autoria própria (2024).

A adesão das plaquetas na superfície das amostras pode levar à rápida ativação de plaquetas, que gera uma série de mudanças na morfologia, incluindo espalhamento, formação de dendritos e agregação (CÂMARA et al., 2020; SABINO et al., 2019). Enquanto plaquetas não ativadas são esféricas, plaquetas durante sua ativação exibem extensões longas em formato de dedos. Já as plaquetas totalmente ativadas são caracterizadas por terem aparência de “ovo frito”, segundo Vlcek et al. (2021).

Os resultados do Experimento 1 nos permitiram responder as hipóteses levantadas e idealizar as próximas etapas dos estudos. A partir deles pode-se concluir que não houve aumento da adesão celular nas amostras após modificação de superfície PEO na liga Ti15Zr15Mo, sendo que a liga sem tratamento apresentou melhores resultados. Além disso, a adição do estrôncio no eletrólito da PEO não aumentou a proliferação e a adesão celular. Porém, pode-se constatar que a superfície contendo Sr permite melhor coagulação sanguínea, conforme resultados do teste de hemocompatibilidade.

Com o objetivo de melhorar os resultados da liga Ti15Zr15Mo após modificação da superfície por PEO, o Experimento 2 foi realizado com grupos submetidos à tratamento térmico depois da etapa PEO. Diversos estudos comprovaram que o tratamento térmico tem impacto na microestrutura e nas propriedades mecânicas do material (CHEN et al., 2014; QIN et al., 2014; SHI et al., 2016; WU et al., 2016), como por exemplo Xavier et al. (2017) que investigaram tratamentos térmicos a baixas temperaturas em seu trabalho com ligas Ti15Zr-xMo e encontraram resultados com potencial para aplicações biomédicas. Como o nosso grupo tem estudado ligas de titânio e, mais recentemente a liga Ti15Zr15Mo, a condição do tratamento térmico escolhida seguiu os parâmetros previamente discutidos nos trabalhos anteriores de calcinação das ligas de titânio (ALVES CLARO et al., 2018; CAROBOLANTE, 2017; ESCADA, NAKAZATO, CLARO, 2017; KONATU, 2014; KONATU et al., 2023; RANGEL et al., 2018). De maneira a obter uma melhor comparação do comportamento da liga após PEO com e sem Sr, a partir dos resultados obtidos nesta pesquisa até então, foram idealizados novos grupos para análise: Controle (Liga Ti15Zr15Mo lixada – TZM), TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado.

5.2 EXPERIMENTO 2

Para o Experimento 2 foram considerados 4 grupos, conforme mencionado nos materiais e métodos, no qual tem o grupo controle (G1 – TZM), amostra após tratamento de

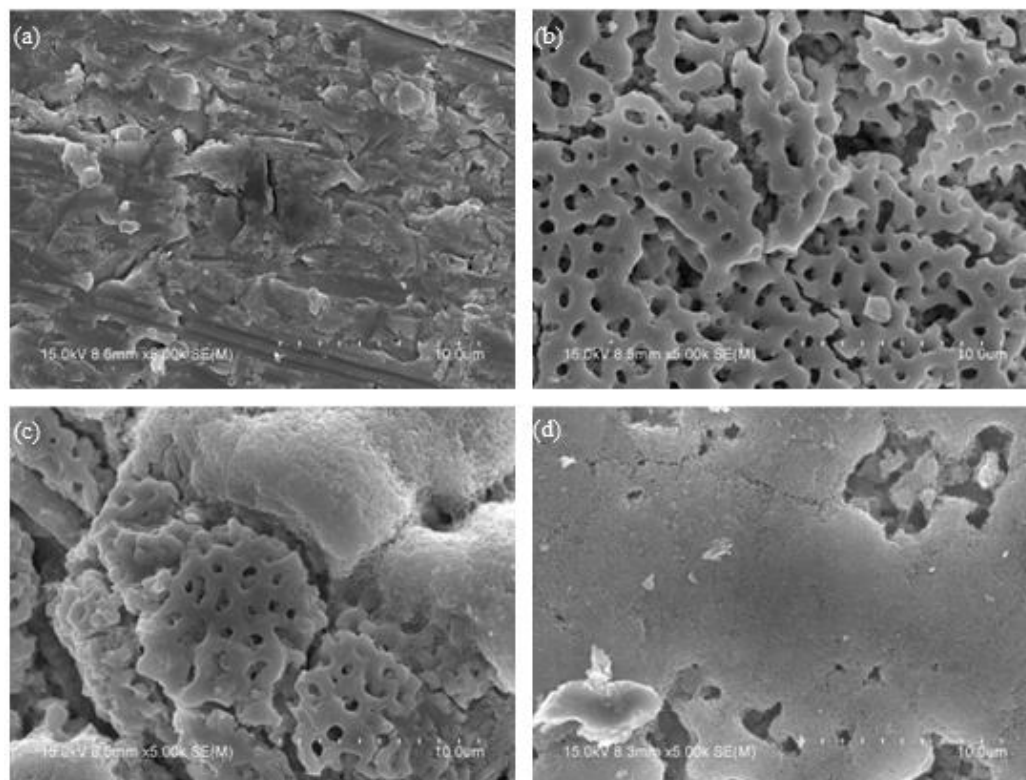
superfície PEO sem Sr (G2 – TZM PEO), amostra após tratamento de superfície PEO sem Sr seguida de calcinação (G3 – TZM PEO Calcinado) e amostra após tratamento de superfície PEO com 0,07 M de Sr seguida por calcinação (G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado).

5.2.1 Caracterização da superfície da liga Ti15Zr15Mo

5.2.1.1 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva

Na Figura 49 pode-se observar as micrografias da superfície da liga Ti15Zr15Mo do Experimento 2. Os grupos estudados foram TZM (Figura 49a), TZM PEO (Figura 49b), TZM PEO Calcinado (Figura 49c) e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (Figura 49d). Na Figura 49b, representando o grupo 2, é possível observar que após o tratamento de superfície PEO foi produzida uma textura na superfície metálica, com microporos. Esses micros poros estão bem separados uns dos outros e distribuídos de forma homogênea no revestimento gerado pela oxidação por plasma eletrolítico. De acordo com a literatura, este tipo de topografia em escala micrométrica é fundamental para imitar a estrutura hierárquica dos ossos naturais, além de poder melhorar consideravelmente as propriedades biológicas e a resposta celular (ELIAZ; METOKI, 2017). Segundo Kostelac et al. (2022), a microestrutura porosa é benéfica por promover ligação do tecido ósseo com o implante. Além disso, estudos mostram que aumentar a área específica dos biomateriais pode acelerar o processo biológico de deposição de apatita e, portanto, melhorar a formação do tecido ósseo (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

Figura 49 - Micrografias da superfície da liga Ti15Zr15Mo após oxidação por plasma eletrolítico, sendo considerado os grupos: (a) Controle (G1 – TZM - Amostra lixada de #100 a #1500), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO Calcinado (G3) e (d) TZM PEO com 0,07 M Sr Calcinado (G4), com ampliação de 5kx.



Fonte: Autoria própria (2024).

As imagens dos grupos 3 e 4 (Figura 49c e Figura 49d, respectivamente) apresentaram formação de uma camada densa de óxido sobre a superfície porosa, formada devido ao tratamento térmico de calcinação após a oxidação por plasma eletrolítico. Importante observar que o grupo que continha estrôncio (G4) apresentou camada mais fina e com maior cobertura da superfície quando comparado ao grupo sem estrôncio (G3). Esses achados foram confirmados com o aspecto da superfície na micrografia, em que as imagens com calcinação ficaram mais claras. Esses resultados não são adequados para aplicações biomédicas, onde superfícies rugosas são preferíveis por melhorar a bioatividade dos implantes e promover a osseointegração. Conforme a literatura, superfícies rugosas incluem regulação da mobilidade das células, melhora na entrega de oxigênio e nutrientes, além de oferecer uma área de superfície maior para a criação do novo tecido ósseo (DZIADUSZEWSKA; ZIELINSKI, 2021). As superfícies com maior área específica de superfície, com poros, tendem a aumentar a adesão de bactérias e implantes sem porosidade têm limitações ao induzir regeneração óssea e fixação do implante, de acordo com a literatura (ELIAZ; METOKI, 2017).

Na Tabela 2 constam os resultados da investigação com EDS, que corroboraram com as imagens do MEV. Nos grupos após o tratamento de superfície PEO (G2, G3 e G4) há a presença de Ca e P, elementos presentes no eletrólito da PEO. No entanto, os teores foram maiores nos grupos após calcinação (G3 e G4). De acordo com Dorozhkin; Epple (2002), CaP em uma superfície porosa pode permitir o crescimento do tecido ósseo e de células. Pode-se observar também a presença do elemento Sr no Grupo 4, confirmando que a PEO foi capaz de produzir filmes finos na superfície da liga metálica Ti15Zr15Mo (CAPUCCINI et al., 2008). Conforme estudos de Kostelac et al. (2022), a superfície rugosa gerada pelo tratamento de superfície aumenta a presença destes elementos na superfície das amostras. No grupo controle (G1 - TZM), os elementos majoritários são os elementos de liga Ti, Zr e Mo. Além disso, a partir da tabela nota-se que Al foi depositado nos grupos G1 e G2, entretanto, não aparece nos grupos G3 e G4. A hipótese é que o alumínio é uma impureza, provavelmente da etapa de processamento da liga e que a calcinação remove as impurezas e a contaminação. O oxigênio deve ser proveniente dos óxidos utilizados no eletrólito e também da possível formação de TiO_2 , característica das ligas de titânio.

Tabela 2 - Concentração atômica em porcentagem da superfície das amostras de Ti15Zr15Mo antes e após tratamento de oxidação por plasma eletrolítico, analisado por EDS.

Grupo	Ti	Zr	Mo	Ca	P	Sr	Al	O
G1 – TZM	52,09	14,26	9,54	0,26	-	-	8,90	14,95
G2 – TZM PEO	48,05	1,40	3,78	4,06	6,74	-	10,51	25,50
G3 – TZM PEO Calcinado	25,19	-	-	26,56	17,07	-	-	31,18
G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado	18,80	-	-	24,11	17,47	11,82	-	27,80

Fonte: Autoria própria (2024).

A análise da EDS pode fornecer informação das porcentagens atômicas dos elementos presentes na superfície metálica e, a partir desses valores pode-se calcular a relação Ca/P e ter uma evidência se está no intervalo considerado como HA, mas não tem como concluir com certeza se esses elementos estão presentes como HA ou em outras fases diferentes (LUGOVSKOY; LUGOVSKOY, 2014). Neste caso, a relação Ca/P foi de: 0,60 (G2 – TZM PEO); 1,56 (G3 – TZM PEO Calcinado); 1,38 (G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado). Estudos reportaram que a proporção entre Ca e P da HA é 1,67 e que foi observada baixa bioatividade em revestimentos com Ca/P menores do que 1,5 (THUKKARAM et al., 2020). Portanto, nas amostras analisadas na Tabela 2, provavelmente o grupo 3 (TZM PEO Calcinado) possui melhor bioatividade quando comparado aos grupos de PEO sem calcinação (G2) e com Sr calcinado (G4), porém são necessárias mais caracterizações para confirmar a

presença da hidroxiapatita. Liu et al. (2008) realizaram estudos *in vitro* com diversas proporções entre Ca e P e descobriram que apesar da produção de colágeno pelos osteoblastos ser similar entre todos os grupos de fosfato de cálcio estudados, ela foi um pouco menor nas amostras com 1,6 de Ca/P. Ainda, observaram que houve maior atividade da fosfatase alcalina pelos osteoblastos em todas as culturas de células com relação fosfato de cálcio entre 0,5 e 2,5, quando comparadas ao grupo controle, no qual há apenas células na cultura. Segundo Pohrelyuk et al. (2020), uma solução para ajustar a relação Ca/P em revestimentos de hidroxiapatita é regulando o valor do pH do eletrólito da PEO. Em seus estudos, utilizaram o método térmico no substrato e a mudança no pH de 4 para 8 permitiu o aumento de Ca/P na camada de hidroxiapatita formada.

5.2.1.2 Difração de raios X

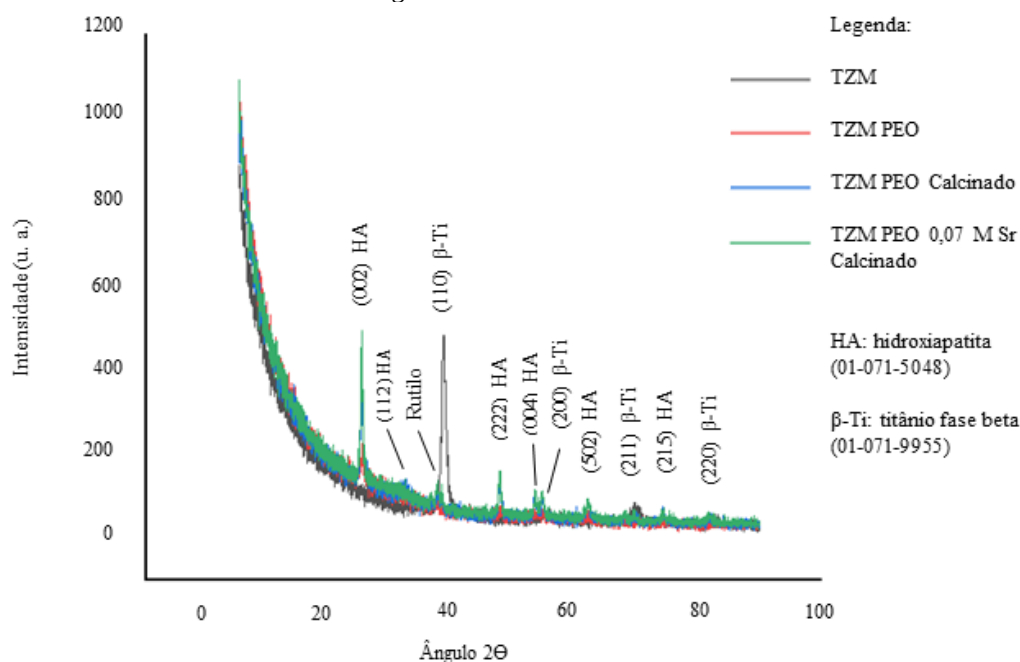
A análise de DRX foi realizada para confirmar a presença da hidroxiapatita. Na Figura 50 pode-se observar os difratogramas das amostras realizados nos grupos TZM, TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado. Na amostra do grupo TZM (cor preta) pode-se observar picos mais intensos característicos da fase beta das ligas de titânio, sendo que mostra seu maior pico em aproximadamente 40° (110) (LI et al., 2010), que refletem o substrato (KOSTELAC et al., 2022). Por sua vez, as curvas do grupo TZM PEO (cor vermelha) são as que apresentam menores intensidades, apesar de ser possível observar picos da hidroxiapatita e menores da fase beta. Em relação aos grupos calcinados, ambos apresentam as mesmas fases mencionadas, com a adição de rutilo na curva do grupo TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (CLYNE; TROUGHTON, 2019). Isso indica que a adição de Ca e P no eletrólito da PEO pode induzir a formação de hidroxiapatita (MING et al., 2023). Este resultado é adequado porque estudos indicam que filmes contendo hidroxiapatita são biologicamente ativos e aumentam a adesão da superfície do implante de liga de titânio (WANG et al., 2022).

A fase β está presente porque o elemento de liga Mo é um forte β -estabilizador (CARDOSO et al., 2023), então os resultados estão de acordo com a literatura. Em comparação com as ligas de titânio com outras fases, a fase beta é adequada para aplicações biomédicas, pois possui vantagens como boa resistência à corrosão, maior módulo de elasticidade e excelente biocompatibilidade (EISENBARTH et al., 2004). Além disso, os

difratogramas de raios X confirmam os resultados de Konatu et al. (2023) em seus estudos com a liga Ti15Zr15Mo.

Uma informação interessante a ser considerada é que não é possível observar picos característicos do estrôncio porque este elemento tem baixa cristalinidade em relação à hidroxiapatita (LI et al., 2010). Ele influencia no comprimento dos picos, o que pode ser observado na curva verde, do grupo com Sr, que tem maior intensidade em relação ao TZM PEO e TZM PEO Calcinado. De maneira geral, a resolução das curvas é boa, indicando um grau de cristalinidade relativamente alto do revestimento, de acordo com estudos com estrôncio (CAPUCCINI et al., 2008).

Figura 50 - Resultados obtidos após caracterização da superfície difração de raios X, conforme grupos indicados na legenda.



Fonte: Autoria própria (2024).

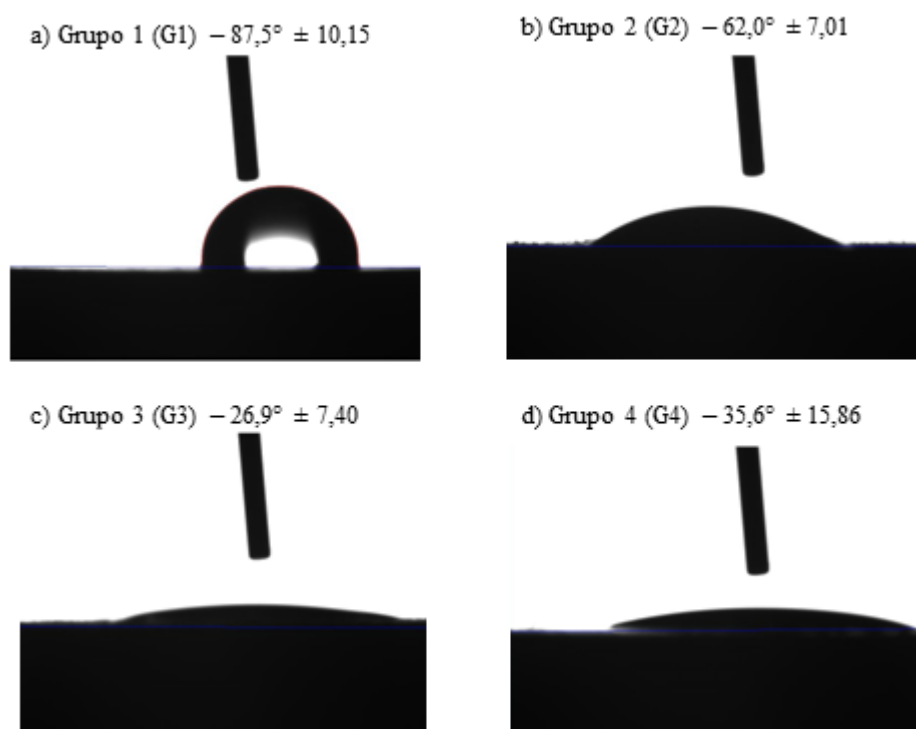
É importante salientar que, em geral, é difícil tratar termicamente os revestimentos da PEO de maneira que modifique a sua estrutura, já que o intervalo da temperatura necessária para gerar uma mudança significativa para tais óxidos é maior ou de valor próximo à temperatura do substrato metálico (CLYNE; TROUGHTON, 2019; WANG et al., 2022).

5.2.1.3 Molhabilidade

Os ângulos de contato dos grupos TZM (G1), TZM PEO (G2), TZM PEO Calcinado (G3) e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (G4) estão demonstrados na Figura 51. Todos os

grupos apresentaram ângulo de contato menor do que 90° , então todos são hidrofílicos, porém os grupos 3 e 4 (Figura 51c e Figura 51d) têm os menores ângulos ($26,9^\circ$ e $35,6^\circ$, respectivamente). Há estudos que sugerem que uma superfície de titânio com hidrofilicidade moderada, entre 20 e 40° , e rugosa exibem o mais alto nível de fixação celular (HARA et al., 2012; NOVAES et al., 2010).

Figura 51 - Resultados obtidos na análise do ângulo de contato, por meio do método de gota séssil, considerando os meios ar, água e superfície da liga Ti15Zr15Mo: (a) TZM (G1); (b) TZM PEO (G2); (c) TZM PEO Calcinado (G3); (d) TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (G4).



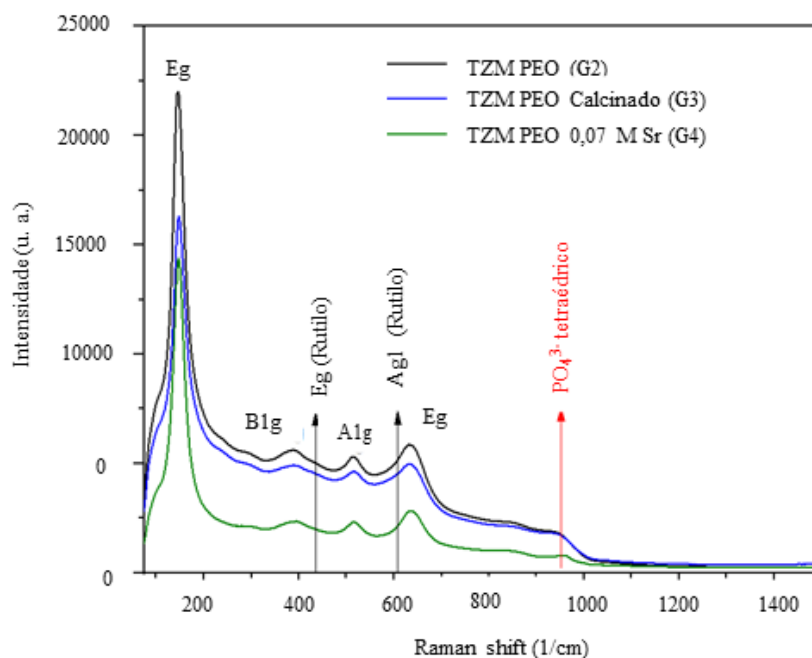
Fonte: Autoria própria (2024).

Quando comparado à superfície do grupo controle (G1), a superfície porosa do grupo após tratamento PEO diminuiu um pouco o ângulo de contato. A fase rutilo, que foi confirmada na caracterização por DRX, tem característica hidrofílica, então como a PEO e a calcinação geraram essa fase, o ângulo de contato tende a decrescer em relação ao grupo controle (CARDOSO et al., 2023). Porém, os grupos que foram submetidos à calcinação tiveram alterações em seus ângulos de contato mais drásticas, indicando que o tratamento térmico influenciou na molhabilidade das amostras.

5.2.1.4 Espectroscopia Raman

Na Figura 52 pode-se observar os resultados obtidos na espectroscopia Raman para os grupos TZM PEO (G2 – cor preta), TZM PEO Calcinado (G3 – cor azul) e TZM PEO 0,07 M Calcinado (G4 – cor verde). Como a espectroscopia Raman é uma caracterização especificamente da superfície, não foi possível obter informações do grupo controle que possui características do *bulk* da liga Ti15Zr15Mo. A partir do gráfico nota-se picos Raman em 146 cm^{-1} (Eg), 395 cm^{-1} (B1g), 517 cm^{-1} (A1g) e 632 cm^{-1} (Eg) pertencentes à fase anatase. Além disso, há rutilo com a presença de ombros ao redor de 445 cm^{-1} (Eg) e 610 cm^{-1} (A1g). Este resultado está de acordo com Wang et al. (2022), que afirma que o revestimento produzido pela PEO em ligas de titânio produz ambas as fases, anatase e rutilo. Consta também o modo mais intenso próximo a 950 cm^{-1} atribuído aos modos internos da frequência do tetraedro PO_4^{3-} (estiramento simétrico das ligações P-O).

Figura 52 - Resultados da caracterização por espectroscopia Raman dos grupos mencionados na legenda do gráfico.



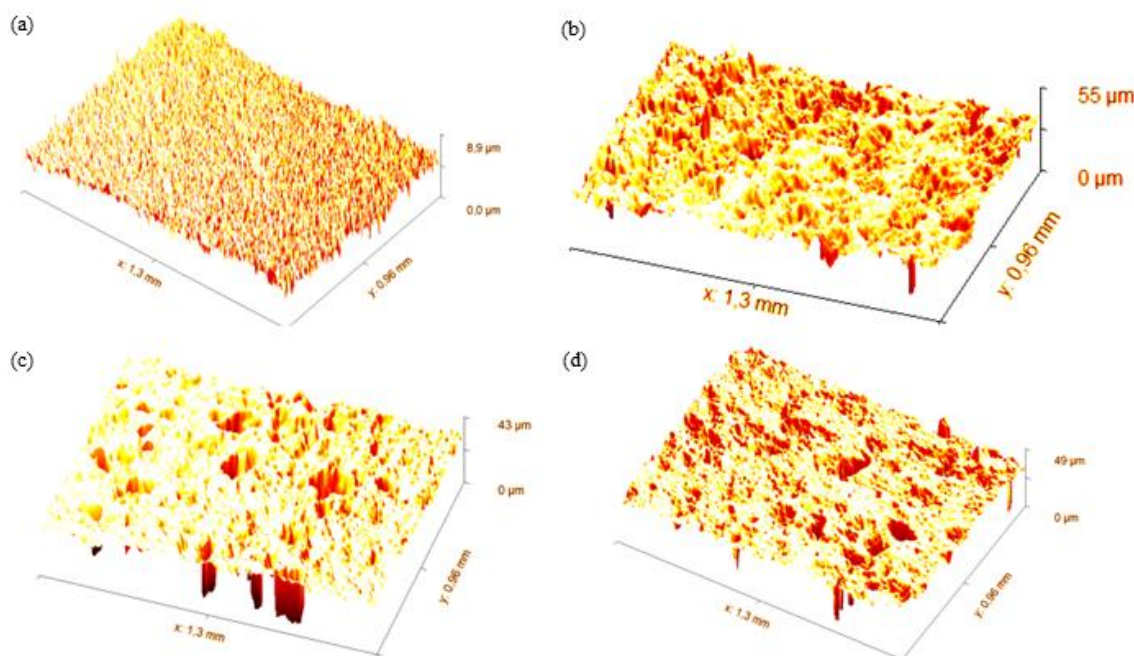
Fonte: Autoria própria (2024).

5.2.1.5 Microscopia confocal

Na Figura 53 observa-se o resultado da microscopia confocal, no qual pode-se analisar que a superfície da amostra do grupo controle (G1 – TZM – Figura 53a) apresenta menor

distância entre a parte mais baixa de seus vales e a parte mais alta de seus picos (8,9 μm). Em contrapartida, o gráfico 3D do grupo TZM PEO (G2 – Figura 53b) possui a maior distância quando comparado aos demais grupos estudados (55 μm). Por sua vez, os grupos calcinados tiveram esse valor semelhante, sendo 43 μm (G3 – TZM PEO Calcinado – Figura 53c) e 49 μm (G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado – Figura 53d), respectivamente. Isso indica que supostamente o grupo 2 possui maior rugosidade em sua superfície e também está de acordo com as micrografias, no qual pode-se observar que é o grupo com os micros poros mais distribuídos, enquanto nos grupos 3 e 4 a calcinação gerou uma camada acima do revestimento da PEO.

Figura 53 - Gráficos resultantes da análise por microscopia confocal dos grupos: (a) TZM, (b) TZM PEO, (c) TZM PEO Calcinado e (d) TZM PEO 0,07 M Calcinado.



Fonte: Autoria própria (2024).

Na Tabela 3 constam os dados obtidos a partir do *software* de domínio público chamado Gwyddion: rugosidade quadrática média (R_q), rugosidade média (R_a), altura máxima do pico (R_p), profundidade máxima da cova (R_v), área projetada e área da superfície. A partir dos dois últimos valores, pode-se obter a rugosidade superficial (R_s), que é a divisão da área da superfície sobre a área projetada. A rugosidade média do maior para o menor foi: TZM PEO (3,580 μm), TZM (3,325 μm), TZM PEO Calcinado (3,251 μm) e TZM PEO 0,07 M Calcinado (2,656 μm), indicando que o tratamento térmico realmente diminuiu a rugosidade da superfície, de acordo com as imagens do MEV. Esses valores são maiores do que os encontrados em estudos com titânio comercialmente puro modificados pela PEO,



como por exemplo na pesquisa de Pohrelyuk et al. (2020), que encontraram rugosidades médias de no máximo 2,410. Com isso, pode-se confirmar que a modificação da superfície deste trabalho apresenta resultados de rugosidade adequados para a aplicação biomédica.

Tabela 3 - Dados obtidos no *software* Gwyddion relacionados aos resultados da microscopia confocal.

Grupo	Rq (µm)	Ra (µm)	Rp (µm)	Rv (µm)	Área projetada (mm ²)	Área da superfície (mm ²)	Rs
G1 - TZM	4,031	3,325	10,61	11,57	1,202	1,214	1,010
G2 – TZM PEO	4,832	3,580	20,61	34,03	1,204	1,294	1,075
G3 – TZM PEO Calcinado	5,510	3,251	12,40	30,00	1,200	1,306	1,088
G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado	4,425	2,656	15,25	33,43	1,200	1,264	1,053

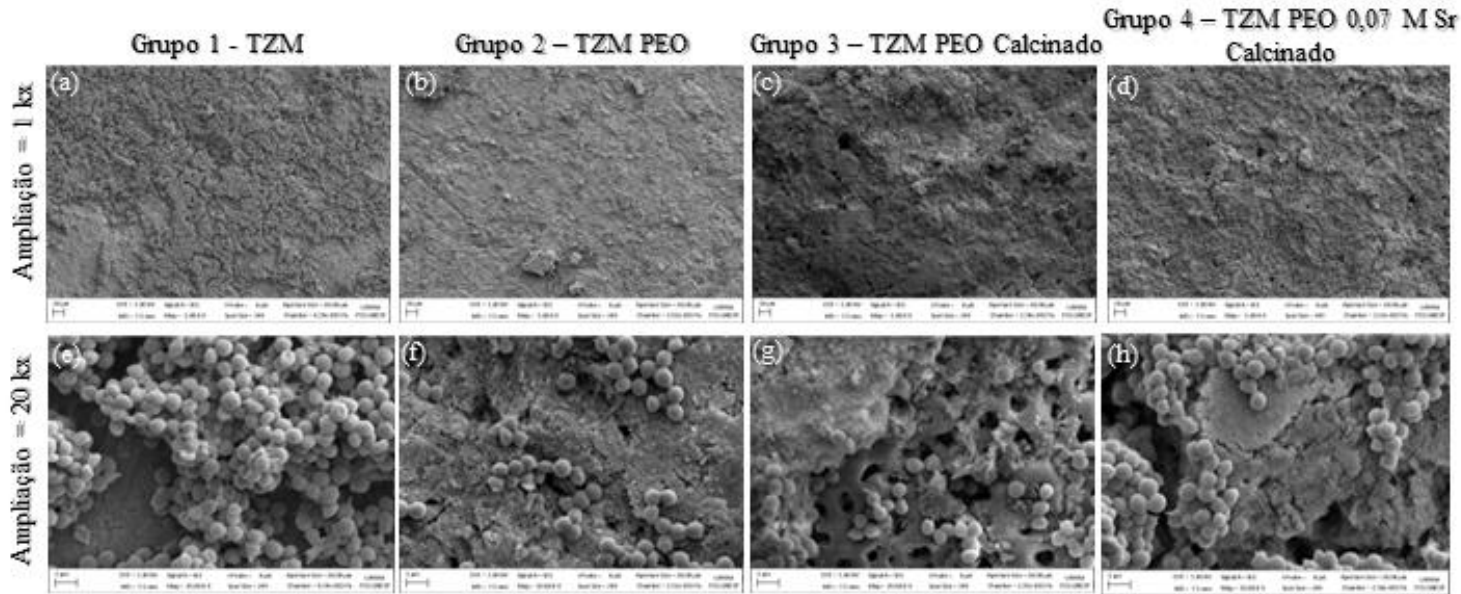
Fonte: Autoria própria (2024).

5.2.2 Caracterização biológica da liga Ti15Zr15Mo

5.2.2.1 Análise da atividade microbiológica

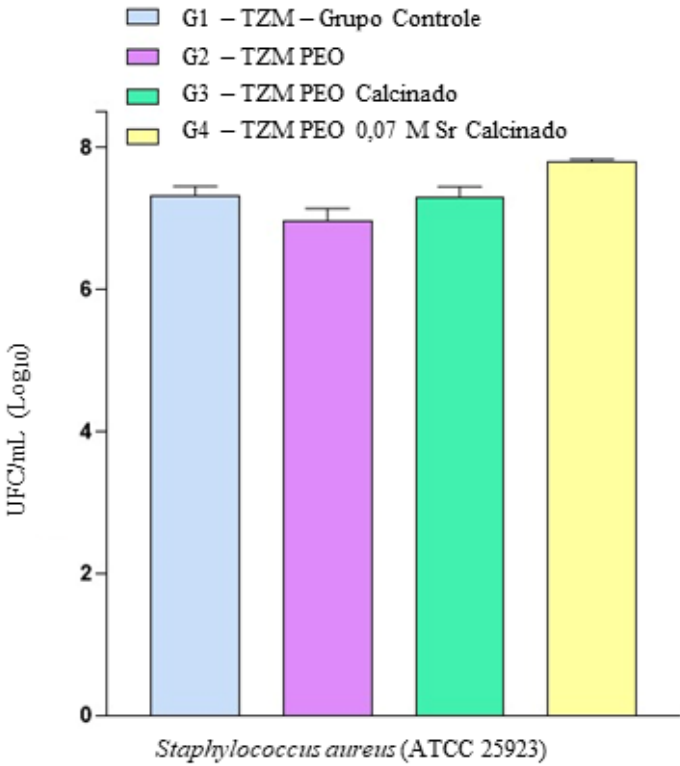
Na Figura 54 pode-se observar as micrografias após ensaios com bactérias. De acordo com a literatura, pode-se afirmar que as bactérias *S. aureus* têm morfologia esférica, formando colônias em formato de “cachos de uva” (MADRUGA et al., 2021b). Dentre os grupos estudados, pode-se perceber que o grupo TZM (G1 – Figura 54e) apresenta elevado número de colônias de bactérias em relação às demais. E na Figura 55 contém a análise estatística, no qual pode-se concluir que, estatisticamente falando, a quantidade de colônias formadas é similar, apesar de ter mais no grupo TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (G4) e menos no grupo TZM PEO (G2), sendo mais adequado neste último grupo quando o objetivo é aplicação biomédica.

Figura 54 - Análise da atividade microbiológica por meio de caracterização por MEV. Os grupos de estudo são: (a) TZM (G1); (b) TZM PEO (G2); (c) TZM PEO Calcinado (G3) e (d) TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (G4).



Fonte: Autoria própria (2024).

Figura 55 - Análise estatística da atividade microbiológica das amostras da liga Ti15Zr15Mo, conforme legenda no gráfico.

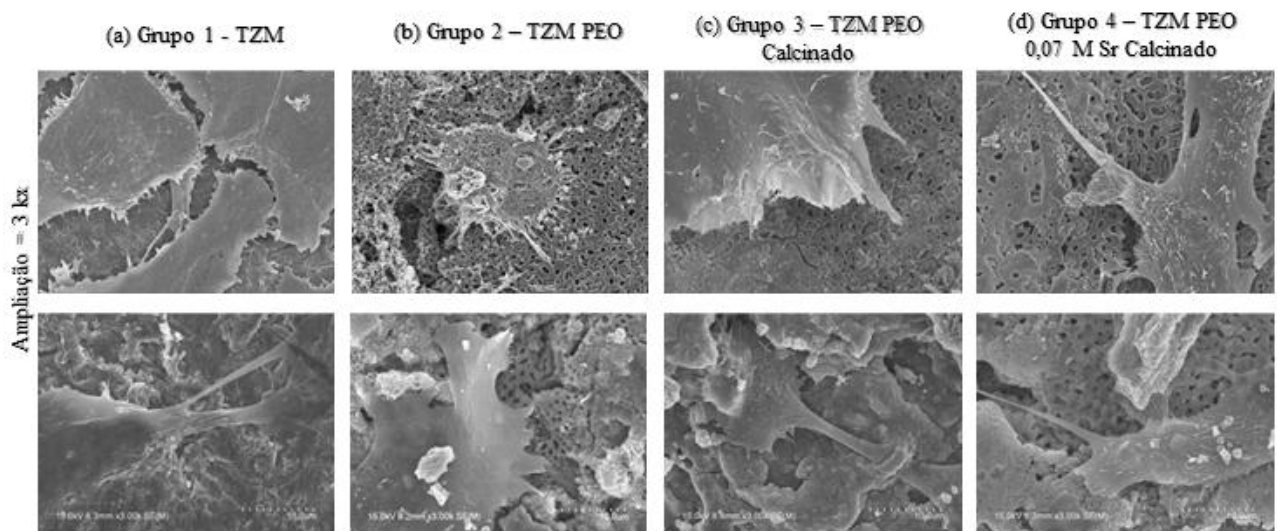


Fonte: Autoria própria (2024).

5.2.2.2 Estudos *in vitro*

Os estudos *in vitro* foram realizados nos grupos TZM (G1 – Grupo controle), TZM PEO (G2), TZM PEO Calcinado (G3) e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (G4). Na Figura 56 é possível observar as imagens realizadas no MEV contendo a morfologia das amostras após 24h de cultura celular. As células foram fixadas com 4% de PFA e desidratadas com etanol em butanol, após foram secas por congelamento. Então, as amostras foram revestidas com ósmio antes da microscopia eletrônica de varredura. As micrografias mostram que no grupo 1 (G1 - TZM - Figura 56a), as células aderiram na superfície do revestimento das amostras, como se estivessem flutuando. Por sua vez, no grupo 2 (G2 - TZM PEO - Figura 56b) pode-se observar que as células aderiram aos micros poros gerados no tratamento de superfície da PEO, indicando ser a condição mais indicada a sem Sr no eletrólito da PEO e sem calcinação. No caso dos grupos 3 e 4 (G3 - TZM PEO Calcinado - Figura 56c e G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado - Figura 56d), nota-se que as células não aderiram na superfície das amostras, similar ao primeiro grupo. Além disso, nestes grupos observa-se que as células não aderiram na parte não porosa da superfície, região que a camada após calcinação cobriu, conforme analisado do MEV das amostras sem células. Isso pode confirmar que a superfície porosa é mais atrativa para adesão das células.

Figura 56 - Micrografias obtidas no microscópio eletrônico de varredura com a morfologia das células após 24h de cultura celular: (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO Calcinado (G3), (d) TZM PEO 0,07 M Calcinado (G4), com ampliação de 3 kx.

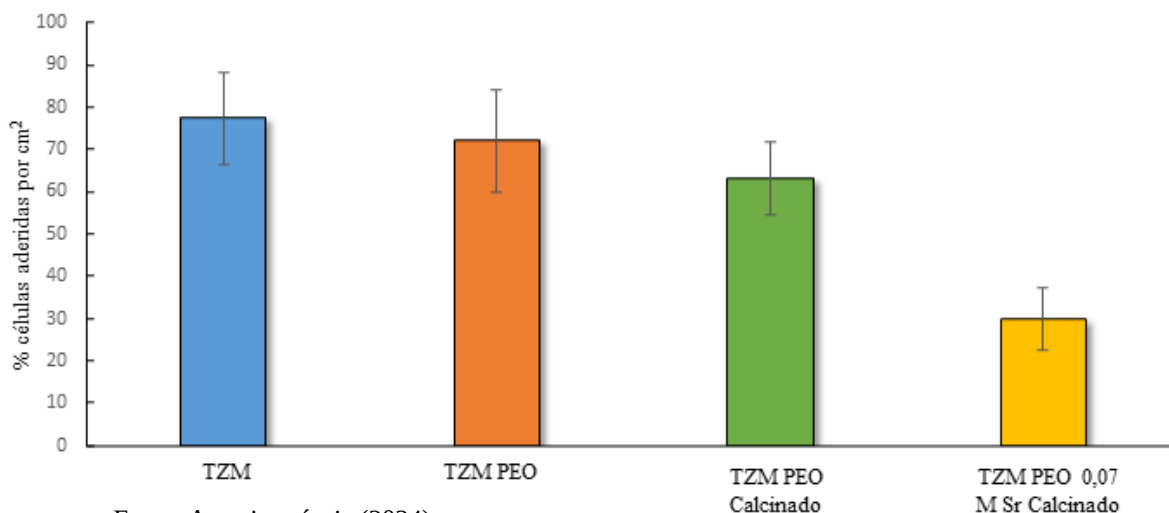


Fonte: Autoria própria (2024).

A Figura 57 apresenta o gráfico com a porcentagem de células aderidas por cm^2 da superfície das amostras estudadas. Nele pode-se observar grande correlação em relação aos resultados das micrografias da Figura 56, no qual a quantidade de células aderidas diminui dos grupos 1 ao 4. Esses resultados demonstram que a adesão celular do grupo TZM (G1) é similar estatisticamente ao grupo TZM PEO (G2), havendo maior quantidade de células aderidas. Em contrapartida, os grupos com calcinação após o tratamento PEO sugerem que as células aderem menos, sendo consideravelmente menor no grupo com Sr no eletrólito (G4), cerca de metade em relação ao grupo TZM PEO Calcinado (G3). Com isso, até então pode-se concluir que o grupo com mais resposta celular quando comparado aos demais grupos estudados foi o grupo TZM PEO (G2).

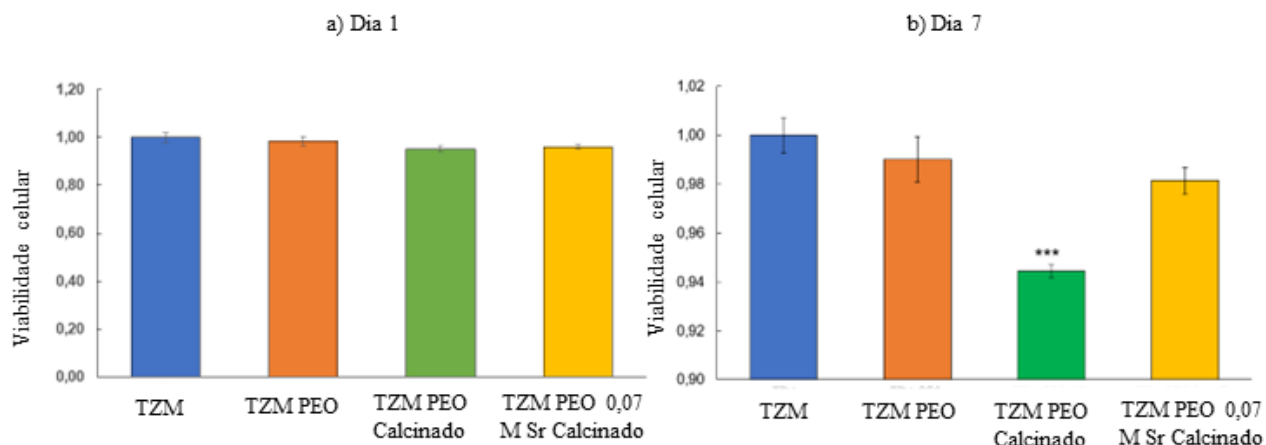
Estudos concluíram que revestimentos da PEO com eletrólito contendo fosfato de cálcio tendem a produzir uma camada uniforme na superfície do material e exibem forte adesão celular ligadas à oxidação do substrato (MING et al., 2023). Esta característica é importante para aplicações biomédicas porque os implantes são sujeitos à encapsulamento fibroso quando *in vivo*, geralmente acompanhado por adesão celular inadequada na sua superfície, resultando em desestabilização do implante e inibição da regeneração óssea. Portanto, as consequências para falta de adesão celular são a rejeição e falha do implante, segundo Neacsu et al. (2015). De acordo com Kostelac et al. (2022), a migração e adesão de células em um implante é um dos requisitos para a geração do tecido ósseo, para isso, a proliferação e diferenciação celular depende não apenas de sua composição química ou da camada de óxido formada, mas também da porosidade e rugosidade da superfície.

Figura 57 - Gráfico com resultados do ensaio de adesão, com a porcentagem das células aderidas por cm^2 da superfície das amostras de cada grupo: TZM (G1), TZM PEO (G2), TZM PEO Calcinado (G3) e TZM PEO 0,07 M Calcinado (G4).



Os resultados obtidos no teste AlamarBlue® mostraram que as células proliferaram em todas as superfícies, como pode-se observar na Figura 58. Este ensaio avalia a viabilidade e proliferação celular por meio da sua atividade metabólica, importante para analisar se a modificação de superfície e o tratamento térmico inibem as células quando em contato com a superfície (MANIVASAGAM; POPAT, 2021). No Dia 1 (Figura 58a), pode-se observar que a viabilidade celular entre os grupos não tem diferença significativa estatisticamente, sendo um pouco menor no grupo TZM PEO Calcinado (G3). No entanto, observa-se no Dia 7 (Figura 58b) que os melhores resultados foram verificados no grupo controle (G1 – TZM), com uma redução na proliferação celular das amostras que foram tratadas com PEO, principalmente no grupo 3 (G3 – TZM PEO Calcinado). De maneira geral, a partir dos resultados da análise da viabilidade celular por AlamarBlue®, pode-se concluir que a melhor condição é do grupo sem tratamento de superfície (G1 - TZM), seguida do grupo após PEO (G2 – TZM PEO), em terceiro o grupo G4 (TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado) e G3 (TZM PEO Calcinado). Tais conclusões estão de acordo com os resultados do MEV e da adesão celular, pois indicam que o grupo TZM e o grupo de amostras TZM PEO são mais indicados para serem utilizados em aplicações biomédicas.

Figura 58 - Resultados da análise da viabilidade celular determinada por AlamarBlue®. Os testes foram realizados após (a) 1 dia e (b) 7 dias de incubação, nos grupos de estudo TZM, TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado.

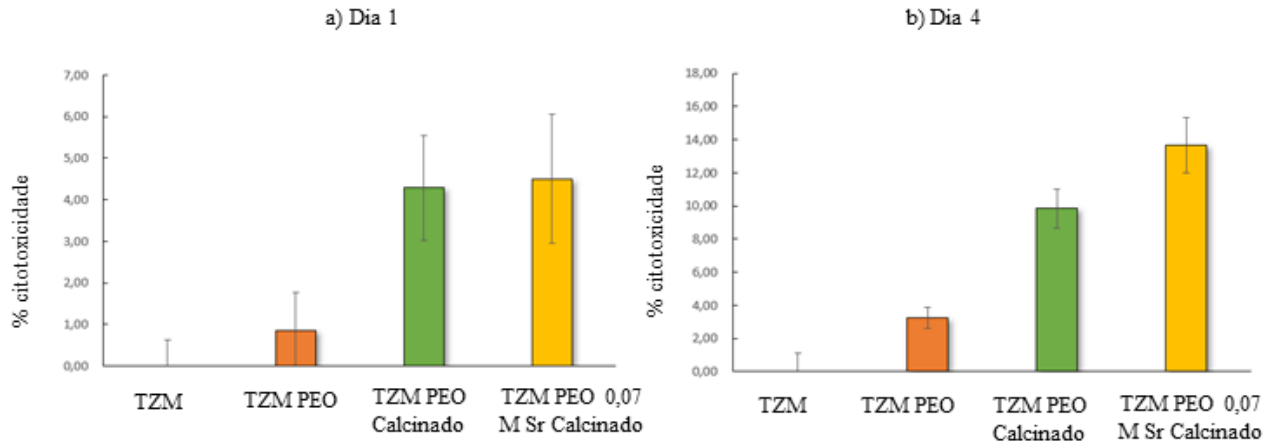


Fonte: Autoria própria (2024).

A adesão e a proliferação dos osteoblastos podem estar relacionadas com a molhabilidade da superfície do material, no qual as células exibem preferência para substratos hidrofílicos (LIM et al., 2004). Eliaz; Metoki (2017) descobriu em estudos *in vitro* que superfície com alta hidrofiliicidade em um revestimento de HA melhora a bioatividade do material e que células osteoblásticas derivadas de ratos ligam-se preferencialmente a superfícies hidrofílicas.

Na Figura 59 pode-se observar os gráficos resultantes dos ensaios de citotoxicidade com o comercialmente disponível LDH, após 1 e 4 dias de incubação das células, no qual pode-se avaliar o dano na membrana celular e a citotoxicidade baseada na liberação de LDH no meio de cultura celular. A PEO é um tratamento que modifica a superfície das amostras e sua topografia, portanto, é essencial avaliar se essas possíveis alterações induzem toxicidade nas células. As células param de crescer e eventualmente morrem quando se deparam com um ambiente tóxico (TCHOUNWOU et al., 2012). Consequentemente, é importante analisar se o corpo hospedeiro pode tolerar o implante sem rejeitar ou matar células. Antes de morrer, as células quebram ao perder suas membranas e liberam no meio de cultura uma enzima chamada LDH (MANIVASAGAM; POPAT, 2021). A partir dos resultados do Dia 1 (Figura 59a) observa-se que os grupos com tratamento térmico de calcinação são mais citotóxicos em relação ao TZM e TZM PEO. No Dia 4 continua essa tendência, confirmando as conclusões anteriores dos ensaios *in vitro*, de que o grupo sem tratamento de superfície e o grupo apenas com revestimento PEO são mais indicados para aplicações biomédicas.

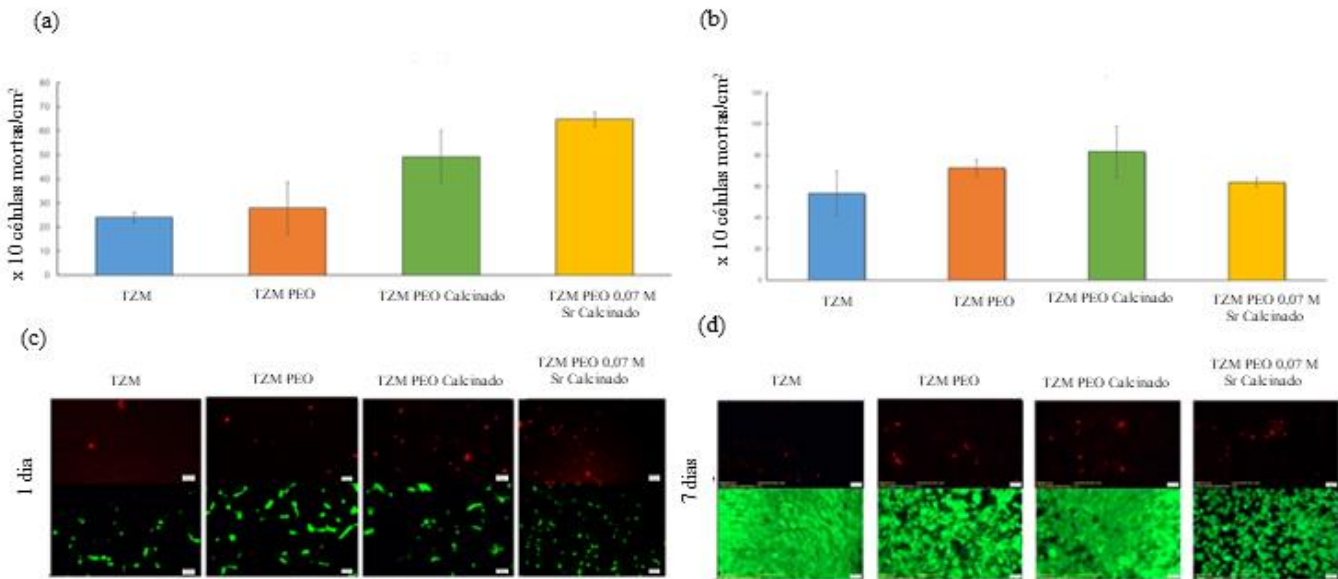
Figura 59 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade com LDH após (a) 1 dia e (b) 4 dias de incubação, nas amostras dos grupos TZM, TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado.



Fonte: Autoria própria (2024).

Na Figura 60 pode-se observar os resultados obtidos nos ensaios vivo/morto, após 1 dia (Figura 60a) e 7 dias (Figura 60b) de cultura celular. Na Figura 60c e Figura 60d estão apresentadas as imagens resultantes da análise da imunofluorescência após Dia 1 e Dia 7, respectivamente. É possível observar que após 24 h houveram mais células mortas por área das amostras dos grupos calcinados. No entanto, no Dia 7, o grupo 4 (G4 – TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado) manteve a quantidade de células mortas, enquanto as demais aumentaram. Com isso, a melhor condição seria deste grupo.

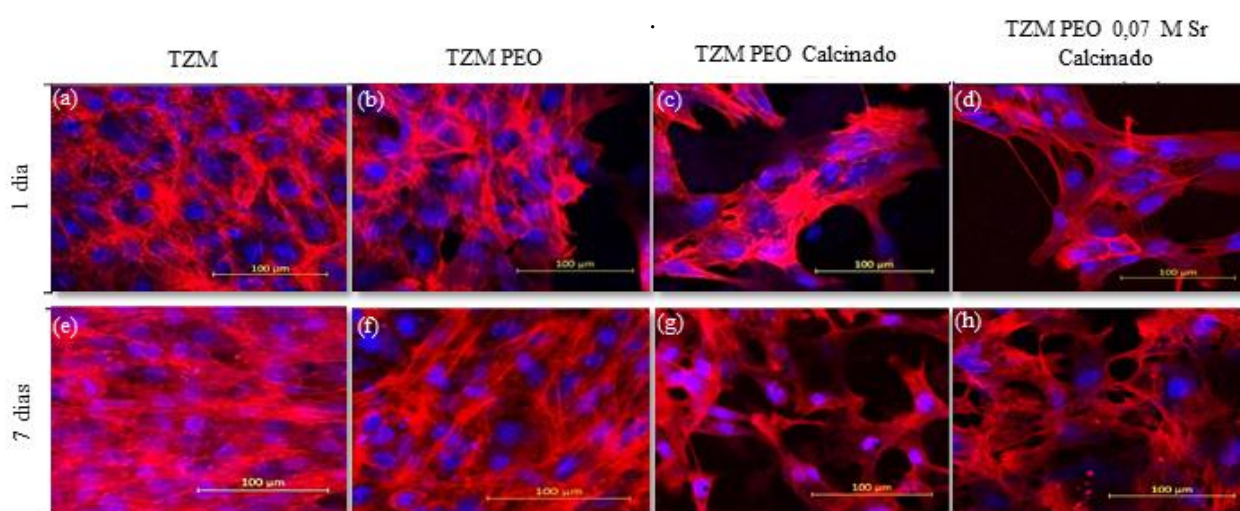
Figura 60 - Resultados dos ensaios vivo/morto dos grupos TZM, TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado: (a) Análise estatística com a quantidade de células mortas após 1 dia e (b) 7 dias de incubação. Imagens de microscopia de fluorescência das células após (c) 1 dia e (d) 7 dias de incubação.



Fonte: Autoria própria (2024).

Na Figura 61 pode-se observar as imagens de microscopia de fluorescência das amostras após tingimento com Faloidina/Rodamina, após 1 e 7 dias de cultura celular. Este ensaio é realizado para analisar a dispersão e a ligação entre as células. Quando se compara o Dia 1 com o Dia 7, há uma mesma tendência nas células, no qual há maior quantidade e ligação entre elas nos grupos TZM (G1) e TZM PEO (G2). Assim, confirma que os grupos após calcinação não são tão adequados para aplicações biomédicas.

Figura 61 - Imagens de microscopia de fluorescência das células coradas com Faloidina/Rodamina, após 1 e 7 dias de cultura celular.

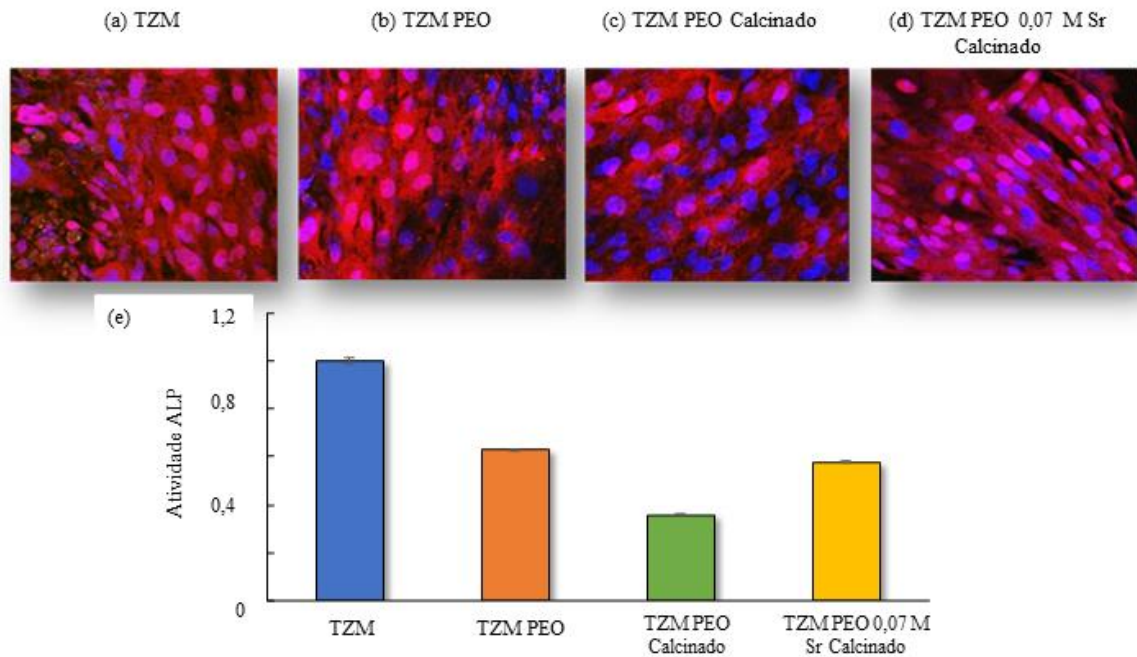


Fonte: Autoria própria (2024).

Na Figura 62 pode-se observar nos itens (a) a (d) as imagens obtidas na microscopia de fluorescência após 14 dias de incubação para os grupos TZM, TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado, respectivamente. Foi utilizado *Redrunx2*, que foca na presença de atividade *runx2*, que é a transcrição de um fator crucial para diferenciação dos osteoblastos. Além dessas análises, na Figura 62e está apresentado o gráfico do teste de atividade de alcalina fosfatase (ALP), uma enzima encontrada no tecido ósseo do corpo humano saudável, que indica a atividade dos osteoblastos e a formação óssea (SUGAWARA et al., 2002). A enzima ALP ajuda também ajuda na produção de hidroxiapatita, segundo Manivasagam; Popat (2021). Tanto nas imagens quanto no gráfico pode-se analisar que há elevada atividade ALP no grupo controle (G1 – TZM), seguida pelo grupo TZM PEO e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado, indicando que há maior atividade os osteoblastos nestes grupos. Neste teste, pode-se concluir que o grupo menos indicado é o TZM PEO Calcinado. Segundo Souza et al. (2020), a elevada quantidade de ALP é diretamente proporcional ao nível de

fosfato inorgânico, um componente da fase mineral do osso e um indicador da diferenciação dos osteoblastos.

Figura 62 - Imagens de microscopia de fluorescência das células adiposas coradas com DAPI e Faloidina/Rodamina, dos grupos (a) TZM (G1), (b) TZM PEO (G2), (c) TZM PEO Calcinado (G3), (d) TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado (G4), (e) gráfico com os resultados dos ensaios ALP.



Fonte: Autoria própria (2024).

Os resultados do Experimento 2 nos permitiram responder as hipóteses levantadas, no qual a liga Ti15Zr15Mo sem tratamento de superfície é indicada para aplicações biomédicas, pois apresentou resultados *in vitro* interessantes para essa aplicação, porém quando se foca na atividade microbiológica, juntamente com as demais caracterizações, a liga TZM após modificação de superfície oxidação por plasma eletrolítico resultou em melhores condições para esta aplicação. As diferenças entre a resposta celular entre as amostras tratadas e não tratadas pode ser relacionada à molhabilidade e rugosidade da superfície (ELIAZ; METOKI, 2017). Isso indica que o tratamento PEO com CaP pode proporcionar maior adesão celular quando comparado aos demais grupos estudados, mesmo que a proporção Ca/P tenha sido menor em relação aos demais (0,60) e que o ângulo de contato seja maior em relação aos grupos com calcinação. Além disso, o tratamento térmico de calcinação após PEO não aumentou a proliferação e a adesão celular, sendo assim tem pouca osseointegração.

Os resultados obtidos confirmam a topografia influencia a proliferação celular e que a superfície com micros poros melhora aumenta a viabilidade e adesão celular na superfície das amostras (WEN et al., 2015). Com isso, afirma-se que a superfície ideal para um implante deve imitar o tecido ósseo, com estrutura hierárquica e rugosidade (MING et al., 2023).

Porém, ao contrário da literatura (LIU et al., 2015), este estudo apresentou resultados de que a modificação da superfície com estrôncio não melhorou a bioatividade *in vitro* das amostras.

Segundo Ming et al. (2023), o tratamento oxidação por plasma eletrolítico pode modificar a superfície dos metais, com o objetivo de mudar características específicas e gerar uma nova topografia no substrato, além de incorporar substâncias na superfície. Essas superfícies com rugosidade moderada proporcionam maior área específica de superfície e estabelecem forte ligação, promovendo integração mais estável do osso com o implante. Cultura de osteoblastos em superfícies rugosas demonstram aumento na produção de colágeno e melhorias nos processos de calcificação.

6 CONCLUSÃO

Materiais para aplicações biomédicas têm sido estudados nos últimos anos para melhorar suas propriedades de superfície e desenvolver biomateriais que interajam com o meio biológico sem gerar reações indesejadas. A possibilidade de modificar a superfície de ligas de titânio por meio da oxidação por plasma eletrolítico possui resultados interessantes que nos motivaram a realizar esta pesquisa com a liga Ti15Zr15Mo, sendo que o trabalho foi dividido em Experimento 1 e Experimento 2.

O Experimento 1 foi realizado com os grupos: TZM, TZM PEO, TZM PEO 0,01 M Sr, TZM PEO 0,04 M Sr, TZM PEO 0,07 M Sr e TZM PEO 0,1 M Sr. Os resultados indicaram que a PEO foi bem sucedida ao criar uma camada porosa na superfície das amostras com Ca, P e Sr. A partir das micrografias, tem-se que o grupo TZM PEO 0,07 M Sr gerou a camada mais homogênea e com poros bem distribuídos por toda a superfície, sendo este grupo o escolhido para realizar a análise biológica.

Com o EDS, conclui-se que todos os grupos têm uma proporção Ca/P menor do que 1,67, que é característica da hidroxiapatita, porém estudos comprovaram que valores menores do que 2 podem promover atividade ALP e aumentar a viabilidade de osteoblastos. Em relação aos difratogramas, pode-se observar fase beta e de hidroxiapatita. No qual, quanto maior a concentração de estrôncio, menor o pico da hidroxiapatita, confirmando a hipótese de que a camada é deficiente em Ca devido à incorporação de Sr substituindo Ca. A partir da molhabilidade, tem-se que todos os grupos após tratamento PEO são hidrofílicos, então melhoraram essa propriedade, porque o grupo controle, sem modificação de superfície é hidrofóbico.

Quanto aos ensaios biológicos, há menos atividade microbiológica nos grupos com Sr e não tem diferença significativa entre eles. Entretanto, nos ensaios *in vitro* houve adesão celular em todas as amostras após 24 h de cultura celular, mas morte celular no dia 7. Além disso, houve proliferação celular apenas no grupo controle (TZM). Com isso, confirma-se a hipótese 1 (H1: A liga Ti15Zr15Mo sem tratamento de superfície é indicada para aplicações biomédicas, mas apresenta baixa adesão celular), porém ainda são necessários mais estudos para afirmar a hipótese 2 (H2: O tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico com fosfato de cálcio pode proporcionar maior adesão celular quando comparado à liga Ti15Zr15Mo sem modificação da superfície). A hipótese 3 (H3: Alguns autores sugerem que

a adição de íons de estrôncio na superfície da amostra durante o tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico pode melhorar a resposta celular) pode ser atestada devido à maior adesão de plaquetas e hemocompatibilidade no grupo TZM PEO 0,07 M Sr, indicando que esta condição tem potencial para aplicações biomédicas.

O Experimento 2 foi realizado com os grupos: TZM, TZM PEO, TZM PEO Calcinado e TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado. Resultados obtidos neste experimento sugerem que o grupo TZM PEO é mais interessante para melhorar as propriedades da liga Ti15Zr15Mo. A partir das imagens do MEV, apesar de todos os grupos apresentarem a formação de uma camada porosa, observa-se que os grupos com calcinação formam uma camada em cima do revestimento PEO, diminuindo a rugosidade e a porosidade das amostras. Assim, a camada com microporos aparentes e mais homogênea por toda a superfície é do grupo TZM PEO sem adição de Sr e sem calcinação.

A partir do EDS, tem-se que todos os grupos possuem relação Ca/P menores que 1,67 e que o mais próximo a esse valor é o TZM PEO Calcinado. Os difratogramas indicam fase beta e hidroxiapatita em todos os grupos, com fase rutilo no grupo TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado. Por sua vez, a espectroscopia Raman sugere presença de anatase, rutilo e fosfato. Resultados da microscopia confocal nos fornecem informações de rugosidade, no qual da maior para a menor foram: TZM PEO, TZM, TZM PEO Calcinado, TZM PEO 0,07 M Sr Calcinado, que está de acordo com as informações obtidas até então de que o grupo da liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície PEO apresentou melhores resultados em relação aos demais, quando o objetivo é aplicação biomédica. Isso pode ser complementado com o teste de atividade microbológica, em que todos os grupos são estatisticamente similares, mas o que apresentou menor formação de colônia de bactérias foi o TZM PEO, em contrapartida, o menos indicado foi o grupo com estrôncio e calcinação.

Conforme esses resultados, pode-se afirmar que o tratamento oxidação por plasma eletrolítico com fosfato de cálcio pode proporcionar maior adesão celular quando comparado aos demais grupos estudados, confirmando a hipótese 1 (H1: A liga Ti15Zr15Mo sem tratamento de superfície é indicada para aplicações biomédicas, mas apresenta baixa adesão celular) e a hipótese 2 (H2: O tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico com fosfato de cálcio pode proporcionar maior adesão celular quando comparado à liga Ti15Zr15Mo sem modificação da superfície). E o tratamento térmico de calcinação após PEO não aumentou a proliferação e a adesão celular como era esperado na hipótese 3 (H3: Alguns

autores sugerem que a calcinação das amostras após tratamento de superfície oxidação por plasma eletrolítico pode melhorar a resposta celular).

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a topografia influencia na proliferação celular e que a superfície com micros poros aumenta a viabilidade e adesão celular na superfície das amostras. Porém, ao contrário da literatura, este estudo apresentou resultados de que a modificação da superfície com estrôncio não melhorou a bioatividade *in vitro* das amostras. Com isso, pode-se concluir que a liga Ti15Zr15Mo após modificação de superfície oxidação por plasma eletrolítico com fosfato de cálcio pode ser levada em consideração na geração de implantes de titânio para aplicações biomédicas, tais como engenharia de tecidos ósseos.

REFERÊNCIAS

AGILAN, P.; RAJENDRAN, N. In-vitro bioactivity and electrochemical behavior of polyaniline encapsulated titania nanotube arrays for biomedical applications. **Applied Surface Science**, v. 439, p. 66-74, 2018.

AGUILAR, C. et al. Influence of porosity on the elastic modulus of Ti-Zr-Ta-Nb foams with a low Nb content. **Metals**, v. 9, n. 2, p. 176-191, 2019.

AI, C.; LIU, L.; GOH, J. C. Pore size modulates in vitro osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in fibronectin/gelatin coated silk fibroin scaffolds. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 124, p. 112088-112100, 2021.

AKTUĞ, S. L. et al. Bioactivity and biocompatibility of hydroxyapatite-based bioceramic coatings on zirconium by plasma electrolytic oxidation. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 1020-1027, 2017.

AKTUG, S. L.; KUTBAY, I.; USTA, M. Characterization and formation of bioactive hydroxyapatite coating on commercially pure zirconium by micro arc oxidation. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 695, p. 998-1004, 2017.

ALVAREZ, K.; NAKAJIMA, H. Metallic scaffolds for bone regeneration. **Materials**, v. 2, n. 3, p. 790-832, 2009.

ALVES CLARO, A. P. R. et al. Incorporation of silver nanoparticles on Ti7.5Mo alloy surface containing TiO₂ nanotubes arrays for promoting antibacterial coating – In vitro and in vivo study. **Applied Surface Science**, v. 455, n. December 2017, p. 780-788, 2018.

ALVES, A. P. R. **Preparação de materiais compósitos in-situ a partir de ligas eutéticas nos sistemas Nb-Al-Ti e Nb-Al-Cr**. 1998. 143 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ANJARD, R. Mayan dental wonders. **J. Oral Implantol.**, v. 9, p. 423-426, 1981.

ARONOV, D. et al. Tunable hydroxyapatite wettability: Effect on adhesion of biological molecules. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2367-2372, 2006.

ARRABAL, R. et al. Characterization of AC PEO coatings on magnesium alloys. **Surface and Coatings Technology**, v. 203, n. 16, p. 2207-2220, 2009.

ATAPOUR, M.; BLAWERT, C.; ZHELUDKEVICH, M. L. The wear characteristics of CeO₂ containing nanocomposite coating made by aluminate-based PEO on AM 50 magnesium alloy. **Surface and Coatings Technology**, v. 357, p. 626-637, 2019.

AVCI, M. et al. Strontium doped hydroxyapatite biomimetic coatings on Ti6Al4V plates. **Ceramics International**, v. 43, p. 9431-9436, 2017.

BAI, L. et al. A multifaceted coating on titanium dictates osteoimmunomodulation and osteo/angio-genesis towards ameliorative osseointegration. **Biomaterials**, v. 162, p. 154-169, 2018.

BAIN, S. D. et al. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. **Osteoporos Int**, v. 20, p. 1417-1428, 2009.

BALA SRINIVASAN, P. et al. Effect of pulse frequency on the microstructure, phase composition and corrosion performance of a phosphate-based plasma electrolytic oxidation coated AM50 magnesium alloy. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 12, p. 3928-3935, 2010.

BEDER, O. E.; STEVENSON J. K.; JONES, T. W. A further investigation of the surgical application of titanium metal in dogs. **Surgery**, v. 41, n. 6, p. 1012-1015, 1957.

BERGMANN, C. P.; STUMPF, A. **Dental Ceramics**. Berlim: Springer, p. 9–13, 2013.

BHAMBRI, S. K; SHETTY, R. H; GILBERTSON, L. N. Optimization of properties of Ti-15Mo-2.8Nb-3Al-0.2Si & Ti-15Mo-2.8Nb-0.2Si-.260 beta titanium alloys for application in prosthetic implants. **American Society for Testing and Materials**, p. 88-95, 1996.

Biocompatibility Assessment Resource Center. FDA. Disponível em:<<https://www.fda.gov/medical-devices/premarket submissions/biocompatibility-assessment-resource-center>>. Acesso em Junho de 2024.

BOBBIO, A. The first endosseous alloplastic implant in the history of man. **Bull. Hist. Dent.**, v. 20, p 1-6, 1972.

BORCIANI, G. et al. Strontium functionalization of biomaterials for bone tissue engineering purposes: A biological point of view. **Materials**, v. 15, n. 5, p. 1724-1757, 2022.

BORDBAR-KHIABANI, A.; YARMAND, B.; MOZAFARI, M. Enhanced corrosion resistance and in-vitro biodegradation of plasma electrolytic oxidation coatings prepared on AZ91 Mg alloy using ZnO nanoparticles-incorporated electrolyte. **Surface and Coatings Technology**, v. 360, p. 153-171, 2019.

BOTHE, R. Reaction of bone to multiple metallic implants. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 71, p. 598-602, 1940.

BOURG, H.; LISLE, A. **Advances in Biology and Medicine**. Hauppauge: Nova Science Publishers, v. 190, p. 231-289, 2011.

BOYAN, B. D. et al. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. **Annu. Rev. Mater. Res.**, v. 31, p. 357-371, 2001.

BOSKEY, A. L.; PASCHALIS, E. Matrix proteins and biomineralization. **Bone Engineering**, p. 44-61, 2001.

BUEHLER, W. J.; GILFRICH, J. V.; WILEY, R. Effect of low-temperature phase changes on the mechanical properties of alloys near composition TiNi. **J. Appl. Phys.**, v. 34, n. 5, p. 1475-1477, 1963.

CÂMARA, P. C. F. et al. Polyelectrolyte multilayers containing a tannin derivative polyphenol improve blood compatibility through interactions with platelets and serum proteins. **Materials Science and Engineering: C**, v. 112, p. 110919-110931, 2020.

CAPELLATO, P. et al. Fibroblast functionality on novel Ti30Ta nanotube array. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 7, p. 2060-2067, 2012.

CAPUCCINI, C. et al. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 6, p. 1885-1893, 2008.

CARDOSO, G. C. et al. Incorporation of Ca, P, Mg, and Zn elements in Ti-30Nb-5Mo alloy by micro-arc Oxidation for biomedical implant applications: surface characterization, cellular growth, and microorganisms' activity. **Coatings**, v. 13, n. 9, p. 1577-1596, 2023.

CAROBOLANTE, J. P. A. **Modificação da superfície da liga experimental Ti10Mo8Nb empregando oxidação anódica - Estudos *in vitro***. 2017. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (Unesp), Guaratinguetá.

CHAHARMAHALI, R.; FATTAH-ALHOSSEINI, A.; ESFAHANI, H. Increasing the in-vitro corrosion resistance of AZ31B-Mg alloy via coating with hydroxyapatite using plasma electrolytic oxidation. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 8, n. 1, p. 39-49, 2020.

CHARNLEY, J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. **J. Bone Joint Surg**, v. 42B, p. 28-30, 1960.

CHEN, H. T. et al. Osseointegrating and phase-oriented micro-arc-oxidized titanium dioxide bone implants. **J. Appl. Biomaterials Funct. Mater.**, v. 19, 2021.

CHEN, H. et al. Porous scaffold design for additive manufacturing in orthopedics: A review. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 8, p. 609-629, 2020.

CHEN, L. Y.; CUI, Y. W.; ZHANG, L. C. Recent development in beta titanium alloys for biomedical applications. **Metals**, v. 10, n. 9, p. 1139-1168, 2020.

CHEN, Y. et al. Effect of aging heat treatment on microstructure and tensile properties of a new b high strength titanium alloy. **J. Alloys Compd.**, v. 586, p. 588-592, 2014.

CHEN, Z. et al. Effect of polarization voltage on the surface componentization and biocompatibility of micro-arc oxidation modified selective laser melted Ti6Al4V. **Mat. Res. Express**, v. 6, n. 8, p. 086425-086441, 2019.

CHENG, S.; WEI, D.; ZHOU, Y. The effect of oxidation time on the micro-arc Titanium dioxide surface coating containing Si, Ca and Na. **Procedia Eng.**, v. 27, p. 713-717, 2012.

CHENG, Y. et al. The effects of anion deposition and negative pulse on the behaviours of plasma electrolytic oxidation (PEO) — A systematic study of the PEO of a Zirloy alloy in aluminate electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 225, p. 47-68, 2017.

CHUNG et al. Plasma electrolytic oxidation of titanium and improvement in osseointegration. **J. Biomed Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 101B, p. 1023-1030, 2013.

CLYNE, T. W.; TROUGHTON, S. C. A review of recent work on discharge characteristics during plasma electrolytic oxidation of various metals. **International Materials Reviews Taylor and Francis Ltd.**, v. 64, n. 3, p. 127-180, 2019.

COHEN, J. Biomaterials in orthopedic surgery. **Am. J. Surg.**, v. 114, p. 31-41, 1967.

CORREA, D. R. N. et al. Effect of the substitutional elements on the microstructure of the Ti-15Mo-Zr and Ti-15Zr-Mo systems alloys. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 4, n. 2, p. 180-185, 2015.

CORREA, D. R. N. et al. Growth mechanisms of Ca- and P- rich MAO films in Ti-15Zr-xMo alloys for osseointegrative implants. **Surface and Coatings Technology**, v. 344, p. 373-382, 2018.

COSTA, A. I. et al. TiO₂ bioactive implant surfaces doped with specific amount of Sr modulate mineralization. **Materials Science and Engineering C**, v. 120, p. 111735-111746, 2021.

CROWLEY, C.; PEMBROKE, T.; BIRKINSHAW, C. Biomaterials in dentistry and medicine. **Biomaterials Developments and Applications**, 2010.

CUI, L. et al. Improved biotribological performance of Ti6Al4V alloy through the synergetic effects of porous TiO₂ layer and zwitterionic hydrogel coating. **Ceram. Int.**, v. 47, p. 34970-34978, 2021.

CUI, X. et al. Preparation of bioactive titania films on titanium metal via anodic oxidation. **Dental Materials**, v. 25, n. 1, p. 80-86, 2009.

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

CURRAN, J. A.; CLYNE, T. W. Thermo-physical properties of plasma electrolytic oxide coatings on aluminium. **Surf Coat Technol.**, v. 199, p. 168-176, 2005.

DAHL, S. G. et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**, v. 28, p. 446-453, 2001.

DANCIU, T. E. et al. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. **FEBS Lett.**, v. 536, p. 193-197, 2003.

DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **J. Dent. Educ.**, v. 67, p. 932-949, 2003.

DAVIS, R. et al. A comprehensive review on metallic implant biomaterials and their subtractive manufacturing. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 120, p. 1473-1530, 2022.

DEAN, J.; GU, T.; CLYNE, T. W. Evaluation of residual stress levels in plasma electrolytic oxidation coatings using a curvature method. **Surface and Coatings Technology**, v. 269, p. 47-53, 2015.

DEHNAVI, V. et al. Effect of duty cycle and applied current frequency on plasma electrolytic oxidation (PEO) coating growth behavior. **Surface and Coatings Technology**, v. 226, p. 100-107, 2013.

DEPPERT, W. R.; LUKACIN, R. Hydroxyapatite chromatography. **J. of C. Library Protein Liquid Chromatography**, v. 61, p. 271–299, 1999.

DICU, M. M. et al. Synthesis and properties of the porous titania coatings formed on titanium by plasma electrolytic oxidation for biomedical application. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 13, n. 3, p. 324-331, 2011.

DINÇER, D. M.; TEKER, C. P.; SAĞ, K. Enhanced bonding of biomimetic apatite coatings on surface-modified titanium substrates by hydrothermal pretreatment. **Surf. Coat. Technol.**, v. 226, p. 27-33, 2013.

DING, M. et al. Early osseointegration of micro-arc oxidation coated titanium alloy implants containing Ag: A histomorphometric study. **BMC Oral Health**, v. 22, p. 628-637, 2022.

DONACHIE, M.J. **Titanium: A technical guide**. Ohio: ASM International, 2000.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infect. Dis.**, v. 7, p. 277-281, 2001.

DOROZHKIN, S. V.; EPPLE, M. Biological and medical significance of calcium phosphates. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 41, p. 3130-3146, 2002.

DZIADUSZEWSKA, M.; ZIELINSKI, A. Structural and material determinants influencing the behavior of porous Ti and its alloys made by additive manufacturing techniques for biomedical applications. **Mater. (Basel)**, v. 14, n. 4, p. 712-760, 2021.

EISENBARTH, E. et al. Biocompatibility of β -stabilizing elements of titanium alloys. **Biomaterials**, v. 25, n. 26, p. 5705-5713, 2004.

ELIAS, L. et al. Microstructural and mechanical characterization of biomedical Ti–Nb–Zr (–Ta) alloys. **Mater. Sci. Eng. A**, v. 432, n. 1–2, p. 108-112, 2006.

ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. **Materials**, v. 10, n. 4, p. 334-438, 2017.

ESCADA, A. L.; NAKAZATO, R. Z.; CLARO, A. P. R. A. Influence of anodization parameters in the TiO₂ nanotubes formation on Ti-7.5Mo alloy surface for biomedical application. **Materials Research**, v. 20, n. 5, p. 1282-1290, 2017.

FATTAH-ALHOSSEINI, A.; MOLAEI, M.; BABAEI, K. Influence of electrolyte composition and voltage on the microstructure and growth mechanism of plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings on tantalum: A review. **Bioanal. Electrochem.**, v. 12, p. 517-535, 2020.

FATTAH-ALHOSSEINI, A. et al. On the enhanced antibacterial activity of plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings that incorporate particles: A review. **Ceramics International**, v. 46, p. 20587-20607, 2020.

FATTAH-ALHOSSEINI, A. et al. Plasma electrolytic oxidation (PEO) process on commercially pure Ti surface: Effects of electrolyte on the microstructure and corrosion behavior of coatings. **Metallurgical and Materials Transactions A: Physical Metallurgy and Materials Science**, v. 49, n. 10, p. 4966-4979, 2018.

FATTAH-ALHOSSEINI, A. et al. Surface characterization of bioceramic coatings on Zr and its alloys using plasma electrolytic oxidation (PEO): A review. **Surfaces and Interfaces Elsevier B.V.**, v. 25, p. 101283-101301, 2021.

FATTAH-ALHOSSEINI, A.; BABAEI, K.; MOLAEI, M. Plasma electrolytic oxidation (PEO) treatment of zinc and its alloys: A review. **Surfaces and Interfaces Elsevier B.V.**, v. 18, p.100441-100455, 2020.

FATTAH-ALHOSSEINI, A.; CHAHARMAHALI, R.; BABAEI, K. Effect of particles addition to solution of plasma electrolytic oxidation (PEO) on the properties of PEO coatings formed on magnesium and its alloys: A review. **Journal of Magnesium and Alloys National Engg. Reaserch Center for Magnesium Alloys**, v. 8, p. 799-818, 2020.

FATTAH-ALHOSSEINI, A.; MOLAEI, M.; BABAEI, K. The effects of nano- and micro-particles on properties of plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings applied on titanium substrates: A review. **Surfaces and Interfaces**, v. 21, p. 100659-100679, 2020.

FAZEL, M. et al. Osteogenic and antibacterial surfaces on additively manufactured porous Ti-6Al-4V implants: Combining silver nanoparticles with hydrothermally synthesized HA nanocrystals. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 120, p. 111745-111759, 2021.

FENG, L. et al. Super-hydrophobic surfaces: From natural to artificial. **Adv. Mater.**, v. 14, p. 1857-1860, 2002.

FIDAN, S. et al. Fabrication of oxide layer on zirconium by micro-arc oxidation: Structural and antimicrobial characteristics. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 565-569, 2017.

GRZESKOWIAK, R. M. et al. Bone and cartilage interfaces with orthopedic implants: A literature review. **Front. Surg.**, v. 7, p. 601244-601259, 2020.

GU, Y. et al. Effect of oxidation time on the corrosion behavior of micro-arc oxidation produced AZ31 magnesium alloys in simulated body fluid. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 543, p. 109-117, 2012.

GUAN, S. et al. Enhanced cytocompatibility of Ti6Al4V alloy through selective removal of Al and V from the hierarchical micro-arc oxidation coating. **Appl. Surf. Sci.**, v. 541, n. 148547, 2021.

HAN, S. K. et al., Effect of surface modification on bio-mechanical properties of titanium alloy Ti6Al4V. **Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 7, 2010.

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

HANAWA, T. Overview of metals and applications. **Metals for Biomedical Devices**, p. 3-24, 2019.

HAO, Y. et al. Aging response of the Young's modulus and mechanical properties of Ti-29Nb-13Ta-46 Zr for biomedical applications. **Metallurgical Mater. Trans. A**, v. 34, n. 4, p. 1007-1012, 2006.

HARA et al. Effect of surface roughness of titanium dental implant placed under periosteum on gene expression of bone morphogenic markers in rat. bull. **Tokyo Dent. Coll.**, v. 53, p. 45-50, 2012.

HEDAYATI, M. et al. The quest for blood-compatible materials: Recent advances and future technologies. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 138, p. 118-152, 2019.

HENCH, L. L.; THOMPSON, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 4, p. S379-S391, 2010.

HEUER, W. et al. Metagenomic analysis of the peri-implant and periodontal microflora in patients with clinical signs of gingivitis or mucositis. **J. Oral Rehabil.**, v. 34, p. 377-382, 2007.

HUANG, L. et al. Responses of bone-forming cells on pre-immersed Zr-based bulk metallic glasses: Effects of composition and roughness. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 395-405, 2011.

HUANG, J. et al. Virulence and adhesion of the *Treponema pallidum* nichols strain simultaneously decrease in a continuous-infection New Zealand white rabbit model. **ACS Infect. Dis.**, v. 9, p. 1221-1231, 2023.

HUSSEIN, R. O.; NIE, X.; NORTHWOOD, D. O. Northwood, An investigation of ceramic coating growth mechanisms in plasma electrolytic oxidation (PEO) processing, **Electrochim. Acta**, v. 112, p. 111-119, 2013.

IM Y. D; LEE, Y. K. Effects of Mo concentration on recrystallization texture, deformation mechanism and mechanical properties of Ti-Mo binary alloys. **J. Alloys Compd.**, v. 821, p. 153508-153516, 2019.

Jl, S. Fabrication of titania/hydroxyapatite composite granules for photo-catalyst. **Mater. Res. Bull.**, v. 44, p. 768-774, 2009.

Jl, Z. et al. Emergency treatment and photoacoustic assessment of spinal cord injury using reversible dualsignal transform-based selenium antioxidant. **Small**, v. 19, n. 35, 2023.

JING, Z. et al. Functionalization of 3D-printed titanium alloy orthopedic implants: A literature review. **Biomed. Mat.**, v. 15, n. 052003, 2020.

KHORASANIAN, M. et al. Microstructure and wear resistance of oxide coatings on Ti-6Al-4V produced by plasma electrolytic oxidation in an inexpensive electrolyte. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, n. 6, p. 1495-1502, 2011.

KINARD, J. T.; MELODY, B. J.; LESSNER, P. M. **Electrolyte for anodizing valve metals**. Greenville: Kemet Electronics Corporation Inc., 1998.

KINNARI, T. J. et al. Influence of surface porosity and pH on bacterial adherence to hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate bioceramics. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 132-137, 2009.

KIRMANIDOU, Y. et al. New Ti-alloys and surface modifications to improve the mechanical properties and the biological response to orthopedic and dental implants: A review. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

KITSUGI, T. et al. Bonding behavior between two bioactive ceramics in vivo. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 21, p. 1109-1123, 1987.

KLAPKIV, M. D.; POVSTYANA, N. Y.; NYKYFORCHYN, H. M. Production of conversion oxide-ceramic coatings on zirconium and titanium alloys. **Mater. Sci.**, v. 42, p. 277-286, 2006.

KOEGLER, W. S.; GRIFFITH, L. G. Osteoblast response to PLGA tissue engineering scaffolds with PEO modified surface chemistries and demonstration of patterned cell response. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2819-2830, 2004.

KOIZUMI, H. et al. Castability and mechanical properties of Ti-15Mo-5Zr-3Al alloy in dental casting. **J. Oral Sci.**, v. 60, n. 2, p. 285-292, 2018.

KONATU, R. T. **Análise da rota de processamento liga Ti30Ta visando aplicação biomédica**. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), Guaratinguetá.

KONATU, R. T. et al. XPS Characterization of TiO₂ nanotubes growth on the surface of the Ti15Zr15Mo alloy for biomedical applications. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 14, n. 7, p. 353-367, 2023.

KOOLEN, M. et al. Bone regeneration in critical-sized bone defects treated with additively manufactured porous metallic biomaterials: The effects of inelastic mechanical properties. **Mater. (Basel)**, v. 13, n. 8, p. 1992-2003, 2020.

KOSTELAC, L. et al. Investigation of hydroxyapatite (HAP) containing coating on grade 2 titanium alloy prepared by plasma electrolytic oxidation (PEO) at low voltage. **Surfaces and Interfaces**, v. 30, p. 101888-101898, 2022.

KROLL, W. The production of ductile titanium. **Trans. Electrochem. Soc.**, v. 78, n. 1, p. 35, 1940.

KRZĄKAŁA, A.; KAZEK-KĘSIK, A.; SIMKA, W. Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys. **RSC Advances**, v. 3, n. 43, 2013.

KURODA, P. A. B.; BUZALAF, M. A. R., GRANDINI, C. R. Effect of molybdenum on structure, microstructure and mechanical properties of biomedical Ti-20Zr-Mo alloys. **Mater. Sci. Eng C**, v. 67, p. 511-515, 2016.

KURODA, P. A. B. et al. Preparation, structural, microstructural, mechanical and cytotoxic b. characterization of as-cast Ti-25Ta-Zr alloys. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 31, n. 19, 2020.

KURODA, P. A. B. et al. Effect of thermomechanical treatments on the phases, microstructure, microhardness and Young's modulus of Ti-25Ta-Zr alloys. **Materials**, v. 12, n. 3210, 2019.

KURODA, Y. et al. Osteoblasts induce Ca^{2+} oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 105, p. 8643-8648, 2008.

LAURÉN, S. Biocompatibility: biomaterial interaction with the biological surrounding. **Biolin Scientific**, 2020. Disponível em: <https://www.biolinscientific.com/blog/biocompatibility-biomaterial-interaction-with-the-biological-surrounding>. Acesso em julho de 2024.

LEE, K. C.; EISIG, S. B.; PERRINO, M. A. Foreign body giant cell reaction to a proplast/Teflon interpositional implant: A case report and literature review. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 76, p. 1719-1724, 2018.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 4742-4753, 2008.

LEVENTHAL, G. S. Titanium, a metal for surgery. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 33, n. 2, p. 473-474, 1951.

LI, H. et al. Antibacterial activity of TiO₂ nanotubes: Influence of crystal phase, morphology and Ag deposition. **Applied Surface Science**, v. 284, p. 179-183, 2013.

LI, J. et al. A two-dimensional semiconducting covalent organic framework with nickel(ii) coordination for high capacitive performance. **J. Mater. Chem. B**, v. 2, p. 283-294, 2014.

LI, Y. et al. The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 9006-9014, 2010.

LIANG, J.; HU, L.; HAO, J. Improvement of corrosion properties of microarc oxidation coating on magnesium alloy by optimizing current density parameters, **Appl. Surf. Sci.**, v. 253, p. 6939-6945, 2007.

LIM, J. Y. et al. Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 68, p. 504-512, 2004.

LIN, L. et al. Enhanced osteoporotic bone regeneration by strontium-substituted calcium silicate bioactive ceramics. **Biomaterials**, v. 34, p. 10028-10042, 2013.

LIN, W. et al. A tunable fluorescent probe for superoxide anion detection during inflammation caused by *Treponema pallidum*. **J. Mater. Chem. B**, v. 11, p. 4523-4528, 2023.

LIU, C. et al. A strontium-modified titanium surface produced by a new method and its biocompatibility in vitro. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015.

LIU, D. et al. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca^{2+} - and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. **Bone**, v. 42, p. 644-652, 2008.

LIU, F. et al. Hydroxyapatite formation on oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. **Ceram. Int.**, v. 32, p. 527-531, 2006.

LIU, H. et al. An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 1472-1479, 2008.

LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface nano-functionalization of biomaterials. **Mater. Sci. Eng., R**, v. 70, p. 275-302, 2010.

LLOPIS-GRIMALT, M. A. et al. Multifunctional properties of quercitrin-coated porous Ti-6Al-4V implants for orthopaedic applications assessed in vitro. **J. Clin. Med.**, v. 9, n. 3, p. 855-866, 2020.

LUGOVSKOY, A.; LUGOVSKOY, S. Production of hydroxyapatite layers on the plasma electrolytically oxidized surface of titanium alloys. **Materials Science and Engineering C**, v. 43, p. 527-532, 2014.

LUO, Y.; YANG, L.; TIAN, M. Application of biomedical-grade titanium alloys in trabecular bone and artificial joints. **Biomaterials and Medical Tribology**, p. 181-216, 2013.

LUTJERING, G.; WILLIAMS, J. C. **Titanium**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2013.

LUTOLF, M. P.; GILBERT, P. M.; BLAU, H. M. Designing materials to direct stem-cell fate. **Nature**, v. 462, p. 433-441, 2009.

LV, Y. et al. Metal material, properties and design methods of porous biomedical scaffolds for additive manufacturing: A review. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 9, p. 641130-641146, 2021.

MADRUGA, L. Y. C. et al. Biocompatible crosslinked nanofibers of poly(vinyl alcohol)/carboxymethyl-kappa-carrageenan produced by a green process. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, n. 1, p. 2000292, 2021a.

MADRUGA, L. Y. C. et al. Enhanced blood coagulation and antibacterial activities of carboxymethyl-kappa-carrageenan-containing nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 273, p. 118541-118553, 2021b.

MANDRACCI, P. et al. Surface treatments and functional coatings for biocompatibility improvement and bacterial adhesion reduction in dental implantology. **Coatings**, MDPI AG, v. 6, n. 7, 2016.

MANIVASAGAM, V. K.; POPAT, K. C. Hydrothermally treated titanium surfaces for enhanced osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. **Materials Science & Engineering C**, v. 128, n. 112315, 2021.

MANTRI, S. S.; MANTRI, S. P. Mantri. The nano era in dentistry **J. Nat. Sci. Biol. Med.**, v. 4, p. 39-44, 2013.

MARIN, E.; BOSCHETTO, F.; PEZZOTTI, G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. **J. Biomed. Mater. Res. Part A**, v. 108, p. 1617-1633, 2020.

MASHTALYAR, D. V. et al. Composite coatings formed using plasma electrolytic oxidation and fluoroparaffin materials. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 767, p. 353-360, 2018.

MATSUDA, Y. et al. Femoral componente made of Ti-15Mo-5Zr-3Al alloy in total hip arthroplasty. **J. Orthop. Sci.**, v. 2, n. 3, p. 166-170, 1997.

MATYKINA, E. et al. Transmission electron microscopy of coatings formed by plasma electrolytic oxidation of titanium. **Acta Biomater.**, v. 5, p. 1356-1366, 2009.

MCKEE, G. K.; WATSON-FARRAR, R. J. Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. **J. Bone Joint Surg**, v. 48, p. 245-259, 1966.

MING, X. et al. Micro-arc oxidation in titanium and its alloys: Development and potential of implants. **Coatings Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**, v. 13, p. 2064-2100, 2023.

MM, T. et al. Antibacterial property of locally produced hydroxyapatite. **Arch. Orofac. Sci.**, v. 2, p. 41-44, 2007.

MOLAEI, M.; BABAEI, K.; FATTAH-ALHOSSEINI, A. Improving the wear resistance of plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings applied on Mg and its alloys under the addition of nano- and micro-sized additives into the electrolytes: A review. **Journal of Magnesium and Alloys National Engg. Research Center for Magnesium Alloys**, v. 9, p. 1164-1186, 2021.

MOLAEI, M.; FATTAH-ALHOSSEINI, A.; GASHTI, S. O. Sodium aluminate concentration effects on microstructure and corrosion behavior of the plasma electrolytic oxidation coatings on pure titanium. **Metallurgical and Materials Transactions A: Physical Metallurgy and Materials Science**, v. 49, n. 1, p. 368-375, 2018.

MOLAEI, M.; FATTAH-ALHOSSEINI, A.; KESHAVARZ, M. K. Influence of different sodium-based additives on corrosion resistance of PEO coatings on pure Ti. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 7, n. 2, p. 247-255, 2019.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Aqueous mediated synthesis of bioresorbable nanocrystalline hydroxyapatite. **J. Cryst. Growth**, v. 274, p. 209-213, 2005.

NAGELS, J.; STOKDIJK, M.; ROZING, P. M. Stress shielding and bone resorption in shoulder arthroplasty. **Journal Shoulder Elbow Surg.**, v. 12, n. 1, 2003.

NAJI CHABUK, Q. K.; SALMAN AL-MURSHDY, J. M.; DAWOOD, N. M. Review: The surface modification of pure titanium by micro-arc oxidation (MAO) process. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1973, n. 012114, 2021.

NAN, K. et al. Strontium doped hydroxyapatite formed by micro-arc oxidation, **Mater. Sci. Eng. C**, v. 29, p. 1554-1558, 2009.

NARAYANAN, T. S. N. S.; PARK, I. S.; LEE, M. H. Strategies to improve the corrosion resistance of microarc oxidation (MAO) coated magnesium alloys for degradable implants: prospects and challenges, **Prog. Mater. Sci.**, v. 60, p. 1-71, 2014.

NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface Royal Society**, v. 5, p. 1137-1158, 2008.

NEACSU, P. et al. In vitro performance assessment of new beta Ti-Mo-Nb alloy compositions. **Materials Science and Engineering C**, v. 47, p. 105-113, 2015.

NI, R. et al. Effect of micro-arc oxidation surface modification of 3D-printed porous titanium alloys on biological properties. *Ann. Transl. Med.*, v. 10, p. 710, 2022.

NIINOMI, M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. **Mater. Sci. Eng. A**, v. 243, n. 1-2, p. 231-236, 1998.

NIKOOMANZARI, E. et al. Impressive strides in antibacterial performance amelioration of Ti-based implants via plasma electrolytic oxidation (PEO): A review of the recent advancements. **Chemical Engineering Journal**, v. 441, n. 136003, 2022.

NOVAES, A. B. et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. **Braz. Dent. J.**, v. 21, p. 471-481, 2010.

OCHSENBEIN, A. et al. Osteoblast responses to different oxide coatings produced by the sol-gel process on titanium substrates. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1506-1517, 2008.

ORTHOPEDIC Biomaterials Market Trends. **Market Analysis Report**, 2024. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/orthopedic-biomaterials-market#>. Acesso em: agosto de 2024.

OSAKA, A et al. Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 2, p. 51-55, 1991.

OSHIDA, Y. et al. Dental implant systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, 2010.

OKAZAKI, Y. A new Ti–15Zr–4Nb–4Ta alloy for medical applications. **Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.**, v. 5, n. 1, p. 45-53, 2001.

PARK, J. B. **Introduction in biomaterials science and engineering**. Boston: Springer, 1984.

PELLIZZARI M. et al. A 3D-printed ultralow Young's modulus β -Ti alloy for biomedical applications. **Materials**, v. 13, n. 12, p. 2792-2808, 2020.

PESODE, P.; BARVE, S. Surface modification of titanium and titanium alloy by plasma electrolytic oxidation process for biomedical applications: A review. **Mater. Today Proc.**, v. 46, p. 594-602, 2021.

PILLONETTO, M. et al. The experience of implementing a national antimicrobial resistance surveillance system in Brazil. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. 575536, p. 1-20, 2021.

PODPORSKA-CARROLL, J. et al. Antimicrobial properties of highly efficient photocatalytic TiO₂ nanotubes. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 176-177, p. 70-75, 2015.

POHRELYUK, I. M. et al. Formation of hydroxyapatite coatings on Titanium by plasma-electrolytic oxidation in alkaline electrolytes. **Materials Science**, v. 55, n. 4, p. 95-99, 2020.

PONSONNET, L. et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. **Materials Science and Engineering C**, v. 23, n. 4, p. 551-560, 2003.

QIN, D. et al. On preparation of bimodal Ti-5Al-5V-5Mo-3Cr-0.4 Si (Ti-5553s) alloy: ap b forging and heat treatment. **Mater. Sci. Eng. A**, v. 609, p. 42-52, 2014.

QIU, Q. et al. Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 42, p. 117-127, 1998.

RABIEE, S. M.; MOZTARZADEH, F.; SOLATI-HASHJIN, M. Synthesis and characterization of hydroxyapatite cement. **J. Mol. Struct.**, v. 969, p. 172-175, 2010.

RAFFA, M. L. et al. Stress shielding at the bone-implant interface: Influence of surface roughness and of the bone-implant contact ratio. **J. Orthop. Res.**, v. 39, p. 1174-1183, 2021.

RAMA KRISHNA, L.; POSHAL, G.; SUNDARARAJAN, G. Influence of electrolyte chemistry on morphology and corrosion resistance of micro arc oxidation coatings deposited on magnesium. **Metallurgical and Materials Transactions A: Physical Metallurgy and Materials Science**, v. 41, n. 13, p. 3499-3508, 2010.

RANA, M. et al. Design and manufacturing of biomimetic porous metal implants. **J. Mat. Res.**, v. 36, p. 3952–3962, 2021.

RANGEL, A. L. R. et al. Modification of the Ti15Mo alloy surface through TiO₂ nanotube growth — an in vitro study. **Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials**, v. 16, n. 4, p. 222-229, 2018.

RAO, X.; CHU, C. L.; ZHENG, Y. Y. Phase composition, microstructure, and mechanical properties of porous Ti-Nb-Zr alloys prepared by a two-step foaming powder metallurgy method. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 34, p. 27-36, 2014.

RASOULI, R.; BARHOUM, A.; ULUDAG, H. A review of nanostructured surfaces and materials for dental implants: Surface coating, patterning and functionalization for improved performance. **Biomaterials Science Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 1312-1338, 2018.

RATNER, B. D. Biomaterials: Been there, done that, and evolving into the future. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 21, p. 171-191, 2019.

RATNER, B. D.; ZHANG, G. A history of biomaterials: An introduction to materials in medicine. **Biomaterials Science**, 4 ed., p. 41-44, 2020.

RIBEIRO, L. M. S. **Utilização do compósito P(VDF- TrFE)/BaTiO₃ como revestimento de implantes da liga Ti-30Ta para aplicações biomédicas**. 2019. 147 f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Química de Minas Gerais), Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Itajubá.

RIBEIRO, T. A. N. **Síntese de derivados imidazo-pirazolo pirimidínicos para avaliação da atividade antibacteriana**. 2022. 120 f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Química de Minas Gerais), Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Itajubá.

ROACH, P. et al. Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications. **J. Mater Sci.**, v. 18, p. 1263-1277, 2007.

ROBINSON, H. J. et al. Cell adhesion to plasma electrolytic oxidation (PEO) titania coatings, assessed using a centrifuging technique. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 8, p. 2103-2112, 2011.

ROGOV, A. B.; SLONOVA, A. I.; MIRONOV, I. V. The influence of homogeneous electrolyte composition on microplasma synthesis and characteristics of Fe-containing coatings on A1050 alloy. **Applied Surface Science**, v. 287, p. 22-29, 2013.

ROKNIAN, M. et al. Study of the effect of ZnO nanoparticles addition to PEO coatings on pure titanium substrate: Microstructural analysis, antibacterial effect and corrosion behavior of coatings in Ringer's physiological solution. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 740, p. 330-345, 2018.

ROKOSZ, K. Trends and prospects in surface engineering. **Materials**, v. 15, p. 4839-4842, 2022.

ROKOSZ, K. et al. Development of porous coatings enriched with magnesium and zinc obtained by DC plasma electrolytic oxidation. **Micromachines**, v. 9, n. 7, p. 332-351, 2018.

ROKOSZ, K. et al. Metal ions supported porous coatings by using ac plasma electrolytic oxidation processing. **Materials**, v. 13, n. 17, p. 3838-3856, 2020a.

ROKOSZ, K. et al. Phosphate coatings enriched with copper on titanium substrate fabricated via DC-PEO process. **Materials**, v. 13, n. 6, p. 1295-1314, 2020b.

ROKOSZ, K. et al. Porous coatings containing copper and phosphorus obtained by plasma electrolytic oxidation of titanium. **Materials**, v. 13, n. 4, p. 828-841, 2020c.

ROKOSZ, K. et al. Phosphate porous coatings enriched with selected elements via PEO treatment on titanium and its alloys: A review. **Materials**, v. 13, n. 11, p. 2468-2491, 2020d.

ROSENTHAL, H. L.; COCHRAN, O. A.; EVES, M. M. Strontium content of mammalian bone, diet and excreta. **Environ Res**, v. 5, p. 182-191, 1972.

ROSENTHAL, H. L.; EVES, M. M.; COCHRAN, O. A. Common strontium concentration of mineralized tissues from marine and sweet water animals. **Comp Biochem Physiol**, v. 32; p. 445-450, 1970.

RUDNEV, V. S. Micro- and nano-formations on the surface of plasma electrolytic oxide coatings on aluminum and titanium. **Surface and Coatings Technology**, v. 235, p. 134-143, 2013.

RUPP, F. et al. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 76, n. 2, p. 323-334, 2006.

SABAREESWARAN, A. et al. Early osseointegration of a strontium containing glass ceramic in a rabbit model. **Biomaterials**, v. 34, p. 9278-9286, 2013.

SABINO, R. M. et al. Interaction of blood plasma proteins with superhemophobic titania nanotube surfaces. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 21, p. 102046-10271, 2019.

SABINO, R. M.; POPAT, K. C. Evaluating whole blood clotting in vitro on biomaterial surfaces. **Bio-Protocol**, v. 10, n. 3, p. e3505-e3512, 2020.

SANDHYARANI, M.; PRASADA RAO, T.; RAMESHBABU, N. Role of electrolyte composition on structural, morphological and in-vitro biological properties of plasma electrolytic oxidation films formed on zirconium. **Applied Surface Science**, v. 317, p. 198-209, 2014.

SANKARA NARAYANAN, T. S. N.; PARK, I. S.; LEE, M. H. Strategies to improve the corrosion resistance of microarc oxidation (MAO) coated magnesium alloys for degradable implants: Prospects and challenges. **Progress in Materials Science**, v. 60, p. 1-71, 2014.

SARBISHEI, S.; SANI, M. A. F.; MOHAMMADI, M. R. Study plasma electrolytic oxidation process and characterization of coatings formed in an alumina nanoparticle suspension. **Vacuum**, v. 108, p. 12-19, 2014.

SARRAF, M. et al. A state-of-the-art review of the fabrication and characteristics of titanium and its alloys for biomedical applications. **Bio-Design and Manufacturing**, v. 5, p. 371-395, 2022.

SASIKUMAR, Y.; INDIRA, K.; RAJENDRAN, N. Surface modification methods for titanium and its alloys and their corrosion behavior in biological environment: A review. **J. Bio. Tribocorros.**, v. 5, p. 36-54, 2019.

SCHEPERS, E. et al. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. **J. Oral Rehabil.**, v. 18, p. 439-452, 1991.

SCHMIDT, R. et al. Electrochemical deposition of hydroxyapatite on beta-Ti-40Nb. **Surface and Coatings Technology**, v. 294, p. 186-193, 2016.

SCHMIDT, R. et al. Electrodeposition of Sr-substituted hydroxyapatite on low modulus beta-type Ti-45Nb and effect on in vitro Sr release and cell response. **Materials Science and Engineering: C**, v. 108, n. 110425-110437, 2020.

SEMLITSCH, M.; STAUB, F.; WEBER, H. Titanium-aluminium-niobium alloy, development for biocompatible, high strength surgical implants. **Biomed. Eng. Biomed. Technik.**, v. 30, n. 12, p. 334-339, 1985.

SHEN, X. et al. High proportion strontium-doped micro-arc oxidation coatings enhance early osseointegration of titanium in osteoporosis by anti-oxidative stress pathway. **Bioactive Materials**, v. 10, p. 405-419, 2022.

SHI, Y. et al. Effect of heat treatment on the microstructure and tensile properties of deformed a/b Ti-47Zr-5Al-3V alloy. **J. Alloys Compd.**, v. 665, p. 1-6, 2016.

SHOKOUHFAR, M.; ALLAHKARAM, S. R. Formation mechanism and surface characterization of ceramic composite coatings on pure titanium prepared by micro-arc oxidation in electrolytes containing nanoparticles. **Surface and Coatings Technology**, v. 291, p. 396-405, 2016.

SIMCHEN, F. et al. Introduction to plasma electrolytic oxidation-an overview of the process and applications. **Coatings MDPI AG**, v. 10, p. 628-647, 2020.

SIMCHEN, F.; SIEBER, M.; LAMPKE, T. Electrolyte influence on ignition of plasma electrolytic oxidation processes on light metals. **Surface and Coatings Technology**, v. 315, p. 205-213, 2017.

SMALL, I. Testicular tumors: what radiologists need to know—differential diagnosis, staging, and management. **Eur. Cells Mater.**, v. 33, p. 571-585, 1975.

SMIRNOV, I. V. et al. Octacalcium phosphate coating for 3D printed cranioplastic porous titanium implants. **Surf. Coat. Technol.**, v. 383, n. 125192, 2020.

SONG, W. H.; RYU, H. S.; HONG, S. H. Antibacterial properties of Ag (or Pt)-containing calcium phosphate coatings formed by micro-arc oxidation. **J. Biomed. Mater. Res. Part A**, v. 88A, p. 246-254, 2009.

SOUZA, R. F. B. et al. Phosphorylation of chitosan to improve osteoinduction of chitosan/xanthan-based scaffolds for periosteal tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 619-632, 2020.

SOWMYA, S. et al. Chitosan-based polysaccharide biomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, v. 38, p. 1748-1772, 2013.

STOJADINOVIĆ, S. et al. Zirconia films formed by plasma electrolytic oxidation: Photoluminescent and photocatalytic properties. **Optical Materials**, v. 40, p. 20-25, 2015.

SUGAWARA, Y. et al. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 262-269, 2002.

TANG, Y. et al. An improved method for soft tissue modeling. **Biomed. Signal Process. Control**, v. 65, n. 6, p. 102367, 2021.

TANG, Y. et al. The influences of duty cycle on the bonding strength of AZ31B magnesium alloy by microarc oxidation treatment. **Surf. Coat. Technol.**, v. 205, p. 1789-1792, 2010.

TARIQ, U. et al. Calcium to phosphate ratio measurements in calcium phosphates using LIBS. **J. Phys.: Conf. Ser.**, v. 1027, p. 012015-012023, 2018.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy metal toxicity and the environment. **EXS**, v. 101, p. 133-164, 2012.

TERLEEVA, O. P. et al. Effect of microplasma modes and electrolyte composition on micro-arc oxidation coatings on titanium for medical applications. **Surf. Coat. Technol.**, v. 205, p. 1723-1729, 2010.

The European Society for Biomaterials 9th European Conference on Biomaterials. **J. Mater. Sci. Mater. Electron.**, v. 62, p. 1-47, 1991.

THUKKARAM, M. et al. Fabrication of microporous coatings on titanium implants with improved mechanical, antibacterial, and cell-interactive properties. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 27, p. 30155-30169, 2020.

TODROS, S.; TODESCO, M.; BAGNO, A. Biomaterials and their biomedical applications: From replacement to regeneration. **Processes MDPI**, v. 9, p. 1949-1969, 2021.

TOORANI, M.; ALIOFKHAZRAEI, M. Review of electrochemical properties of hybrid coating systems on Mg with plasma electrolytic oxidation process as pretreatment. **Surfaces and Interfaces**, v. 14, p. 262-295, 2019.

TORRENTO, J. E. et al. Bulk and surface design of MAO-treated Ti-15Zr-15Mo-Ag alloys for potential use as biofunctional implants. **Materials Letters**, v. 269, p. 127661-127665, 2020.

TORRES-CERON, D. A. et al. Study of duty cycle influence on the band gap energy of TiO₂/P coatings obtained by PEO process. **Surf. Coat. Technol.**, v. 375, p. 221-228, 2019.

TU, X. et al. Plasma electrolytic oxidation of magnesium alloy AZ31B in electrolyte containing Al₂O₃ sol as additives. **Materials**, v. 11, n. 9, p. 1618-1629, 2018.

VAN HENGEL, I. A. J. et al. The effects of plasma electrolytically oxidized layers containing Sr and Ca on the osteogenic behavior of selective laser melted Ti6Al4V porous implants. **Materials Science and Engineering C**, v. 124, p. 112074-112085, 2021.

VENKATESWARLU, K. et al. Role of electrolyte chemistry on electronic and in vitro electrochemical properties of micro-arc oxidized titania films on cp Ti. **Electrochimica Acta**, v. 105, p. 468-480, 2013.

VERISSIMO, N. C. et al. In situ characterization of the effects of Nb and Sn on the anatase-rutile transition in TiO₂ nanotubes using high-temperature X-ray diffraction. *Applied Surface Science*, v. 307, p. 372-381, 2014.

VICENTE, F. B. et al. The influence of small quantities of oxygen in the structure, microstructure, hardness, elasticity modulus and cytocompatibility of Ti-Zr alloys for dental applications. **Materials**, v. 7, n. 1, p. 542-553, 2014.

VINCE, D. G.; HUNT, J. A.; WILLIAMS, D. F. **Biomaterials**. v. 12, p. 731-736, 1991.

VLCEK, J. R. et al. Bloodcompatible materials: Vascular endothelium-mimetic surfaces that mitigate multiple cell-material interactions. **Advanced Healthcare Materials**, v. 10, n. 7, e2001748, 2021.

WANG, H. et al. The synergistic effect of 3D-printed microscale roughness surface and nanoscale feature on enhancing osteogenic differentiation and rapid osseointegration. **J. Mat. Sci. Technol.**, v. 63, p. 18-26, 2021.

WANG, J. et al. Effect of electrolyte composition on themicrostructure and bio-corrosion behavior of microarc oxidized coatings on biomedical Ti6Al4V alloy. **J. Mat. Res. Technol.**, v. 9, p. 1477-1490, 2020.

WANG, K. K; GUSTAVSON, L. J.; DUMBLETON, J. H. Microstructure and properties of a new beta titanium alloy, Ti-12Mo-6Zr-2Fe, developed for surgical implants. **American Society for Testing and Materials**, p. 76-87, 1996.

WANG, R. et al. Porous construction and surface modification of titanium-based materials for osteogenesis: A review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 973297-973316, 2022.

WANG, Y. et al. Review of the biocompatibility of micro-arc oxidation coated titanium alloys. **Materials and Design**, v. 85, p. 640-652, 2015.

WANG, Z. et al. Biomimetic design strategy of complex porous structure based on 3D printing Ti-6Al-4V scaffolds for enhanced osseointegration. **Mat. Des.**, v. 218, p. 110721-110736, 2022.

WEBB, K.; HLADY, V.; TRESCO, P. A. Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 49, p. 362-368, 2000.

WEBSTER, T. J. Nanophase ceramics: The future of orthopaedic and dental implant material. **Advances in Chemical Engineering**, v. 27, p. 125-166, 2001.

WEN, J. et al. Strontium delivery on topographical titanium to enhance bioactivity and osseointegration in osteoporotic rats. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 24, p. 4790-4804, 2015.

WEN, X. et al. Micro-arc oxidation (MAO) and its potential for improving the performance of titanium implants in biomedical applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023.

WHITESIDES, B. G. M. Whitesides' group: Writing a paper. v. 02138, n. 15, p. 1375-1377, 2004.

WHITTENBERGER, J. D.; MOORE, T. J. Elevated temperature flow strength, creep resistance and diffusion welding characteristics of Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8 Mo. **Metallurgical Trans A**, v. 10, n. 11, p. 1597-1605, 1979.

WILLIAMS, D. F.; DAVID, F. **Definitions in biomaterials**. Chester: Elsevier, 1986.

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

WOZNEY J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 32, p. 160-167, 1992.

WU, G. et al. Investigation of an environmentally friendly coloring coating for magnesium-lithium alloy micro-arc oxidation. **Surfaces and Interfaces**, v. 20, p. 100513-100519, 2020.

WU, S. Q. et al. Microstructural evolution and microhardness of a selective-laser-melted Ti-6Al-4V alloy after post heat treatments. **J. Alloys Compd.**, v. 672, p. 643-652, 2016.

YANG, B. et al. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. **Biomaterials**, v. 25, n. 6, p. 1003-1010, 2004.

YU, J. M.; CHOE, H. C. Morphology changes and bone formation on PEO-treated Ti-6Al-4V alloy in electrolyte containing Ca, P, Sr, and Si ions. **Appl. Surf. Sci.**, v. 477, p. 121-130, 2019.

XAVIER, C. C. et al. Low temperature heat treatments on Ti-15Zr-xMo alloys. **J. Alloys Compd.**, v. 727, p. 246-253, 2017.

XIANG, N. et al. Effects of current density on microstructure and properties of plasma electrolytic oxidation ceramic coatings formed on 6063 aluminum alloy. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 26, n. 3, p. 806-813, 2016.

XIU, P. et al. Tailored surface treatment of 3D printed porous Ti6Al4V by microarc oxidation for Enhanced osseointegration via optimized bone in-growth patterns and interlocked bone/implant interface. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 8, p. 17964-17975, 2016.

XU, L. et al. The microstructure and properties of Ti-Mo-Nb alloys for biomedical application. **J. Alloys Compd.**, v. 453, n. 1-2, p. 320-324, 2008.

XUE, L. et al. A survey of surface treatments to improve the fretting fatigue resistance of Ti-6Al-4V. **WIT Trans. Eng. Sci.**, v. 8, p. 265-272, 1970.

YANG, R.; HAO, Y.; LI, S. Development and application of low modulus biomedical titanium alloy Ti2448. **Biomed. Eng. Trends.**, v. 10, p. 225-247, 2011.

YAO, X.; WANG, X.; DING, J. Exploration of possible cell chirality using material techniques of surface patterning. **Acta Biomater.**, v. 126, p. 92-108, 2021.

YEROKHIN, A. L. et al. Plasma electrolysis for surface engineering. **Surface and Coatings Technology**, v. 122, p. 73-93, 1999.

YEROKHIN, A. L.; LEYLAND, A.; MATTHEWS, A. Kinetic aspects of aluminium titanate layer formation on titanium alloys by plasma electrolytic oxidation. **Applied Surface Science**, v. 200, n. 1-4, p. 172-184, 2002.

YILMAZ, E. et al. Mechanical properties and electrochemical behavior of porous Ti-Nb biomaterials. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 87, n. July, p. 59-67, 2018.

YIN, C. et al. Surface treatment of 3D printed porous Ti6Al4V implants by ultravioleta photofunctionalization for improved osseointegration. **Bioact. Mat.**, v. 7, p. 26-38, 2022.

YOSHINARI, M. et al. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. **Biomaterials**, v. 22, p. 2043-2048, 2001.

ZAOKARI, Y.; PERSAUD, A.; IBRAHIM, A. Biomaterials for adhesion in orthopedic applications: A review. **Engineered Regeneration**, v. 1, p. 51-63, 2020.

ZHANG, L. et al. Advances in microarc oxidation coated AZ31 Mg alloys for biomedical applications. **Corrosion Science**, v. 91, p. 7-28, 2015.

ZHANG, L. C.; CHEN, L. Y. A review on biomedical titanium alloys: Recent progress and prospect. **Adv. Eng. Mat.**, v. 21, n. 1801215, 2019.

ZHANG, J. et al. A comparative study of the osteogenic performance between the hierarchical micro/submicrotextured 3D-printed Ti6Al4V surface and the SLA surface. **Bioact. Mat.**, v. 5, p. 9-16, 2020.

ZHANG, X. et al. X-ray computed tomographic investigation of the porosity and morphology of plasma electrolytic oxidation coatings. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 13, p. 8801-8810, 2016.

ZHANG, W. et al. The synergistic effect of hierarchical micro/nano-topography and bioactive ions for enhanced osseointegration. **Biomaterials**, v. 34, p. 3184-3195, 2013.

ZHANG, Y. et al. Effect of vanadium released from micro-arc oxidized porous Ti6Al4V on biocompatibility in orthopedic applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 366-374, 2018.

ZHANG et al., The influence of UV irradiation on the biological properties of MAO-formed ZrO₂. **Colloids Surf. B**, v. 89, p. 40-47, 2012.

ZHANG, Z. Y. et al. Study on strontium doped bioactive coatings on titanium alloys surfaces by micro-arc oxidation. **Surface and Coatings Technology**, v. 451, p. 129045-129054, 2022.

ZHAO, Q. et al. Antibacterial coatings on titanium implants. **J. Biomed. Mater. Res. Part B**, v. 91, p. 470-480, 2009.

ZHAO, Q. et al. Promotion of bone formation and antibacterial properties of titanium coated with porous Si/Ag-doped titanium dioxide. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 10, p. 1001514-1001528, 2022.

ZHAO, Q. M. et al. Enhanced osteogenic activity and antibacterial ability of manganese–titanium dioxide microporous coating on titanium surfaces. **Nanotoxicology**, v. 14, p. 289-309, 2020.

ZHOU, J.; WANG, X.; ZHAO, L. Antibacterial, angiogenic, and osteogenic activities of Ca, P, Co, F, and Sr compound doped titania coatings with different Sr content. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 14203, 2019.

ZOU, S. et al. 3D printed gelatin scaffold with improved shape fidelity and cytocompatibility by using antheraea pernyi silk fibroin nanofibers. **Adv. Fiber Mat.**, v. 4, p. 758-773, 2022.

ZOU, S. et al. Electrospun regenerated Antheraea pernyi silk fibroin scaffolds with improved pore size, mechanical properties and cytocompatibility using mesh collectors. **J. Mat. Chem. B**, v. 9, p. 5514-5527, 2021.

DADOS CURRICULARES

DANIELLE DUQUE DOMINGUES

NASCIMENTO	11.06.1990 – Pindamonhangaba/ SP/ Brasil
FILIAÇÃO	Manoel Wagner Guedes Domingues Maria Wilza Gonçalves Duque Domingues
NOME EM CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS	DOMINGUES, D. D.
CURRÍCULO LATTES	http://lattes.cnpq.br/3340341275693082
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1961-5043
2010/2016	Curso de Graduação Engenharia de Materiais Faculdade de Engenharia e Ciências do Campus de Guaratinguetá Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
2017/2019	Curso de Pós-Graduação Engenharia Mecânica, nível de Mestrado Faculdade de Engenharia e Ciências do Campus de Guaratinguetá Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
2019/2024	Curso de Pós-Graduação Ciência dos Materiais, nível de Doutorado Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"