



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ÍTALO RIGOTTI PEREIRA TINI

**OSTEOGÊNESE E FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM SUPERFÍCIES
DE TITÂNIO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO DE IMPLANTAÇÃO
IÔNICA POR IMERSÃO EM PLASMA DE OXIGÊNIO**

2019

ÍTALO RIGOTTI PEREIRA TINI

**OSTEOGÊNESE E FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO
SUBMETIDAS AO TRATAMENTO DE IMPLANTAÇÃO IÔNICA POR IMERSÃO
EM PLASMA DE OXIGÊNIO**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Gonçalves dos Reis

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Tini, Ítalo Rigotti Pereira

Osteogênese e formação de biofilmes em superfícies de titânio submetidas ao tratamento de implantação iônica por imersão em plasma de oxigênio / Ítalo Rigotti Pereira Tini. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
77 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.

Orientadora: Luana Marotta Reis Vasconcellos

Coorientador: Adriano Gonçalves Reis

1. Osteogênese. 2. Biocompatibilidade. 3. O-IIIIP. 4. Biofilme. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis, orient. II. Reis, Adriano Gonçalves, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Marianne Spalding

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Newton Soares da Silva

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Campus Urbanova

Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Jonas Rafael de Oliveira

São José dos Campos, 04 de Junho de 2019.

DEDICATÓRIA

À Deus por estar comigo em todos os momentos, bons e ruins, e ter me dado a oportunidade de cumprir com meus objetivos e avançar mais um passo importante na minha vida.

Aos meus familiares, professores e amigos, por estarem sempre presentes e dispostos a me ajudar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço intensamente a minha esposa, **Gabriela Teixeira**, meus pais, **Marisa Ribeiro** e **Maurício Tini**, irmão, **Daniel Rigotti** e demais **familiares (Avós, tios, primos e bisavó)** por estarem sempre presentes e acreditarem na concretização de meus sonhos.

A minha orientadora, Profa. **Luana M. R. Vasconcellos**, e coorientador, Prof. **Adriano G. Reis**, pelos incontáveis ensinamentos e confiança depositada em mim para conclusão do curso de doutorado.

À **Universidade Estadual Paulista e todos seus professores**, pela oportunidade de ensino e aprendizado.

À **banca examinadora da qualificação**, pelas sugestões e críticas que contribuíram para o enriquecimento do trabalho.

Aos **amigos e colegas** de laboratório, que me ajudaram em vários momentos durante o curso de doutorado.

Ao **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE**, em especial ao Dr. Rogério de Moraes Oliveira, pelo tratamento O-IIIP nas amostras.

A **Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP**, em especial a Dra. Danieli Reis e Dr. Eduardo Saito, pela parceria em parte dos resultados.

À **Titaniumfix** pela usinagem dos corpos de prova.

"A ciência pode purificar a religião de erros e superstições. A religião pode purificar a ciência de idolatrias e erros absolutos".

Papa João Paulo II

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Material	20
3.1.1 Amostras de Ti.....	20
3.1.2 Micro Usinagem.....	21
3.1.3 Lavagem Primária.....	21
3.1.4 Tratamento das Amostras por O-IIIIP	22
3.2 Caracterização das Amostras	23
3.2.1 Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV/EDS)	23
3.2.2 Análises por Perfilometria Óptica	24
3.2.3 Análises por Microscopia de Força Atômica (MFA)	25
3.2.4 Análises por Difração de Raios X (DRX).....	25
3.2.5 Análise da Molhabilidade de Superfície	26
3.2.6 Análises de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).....	26
3.3 Análises celulares <i>in vitro</i>	28
3.3.1 Linhagem Celular e Meio de Cultura.....	28
3.3.2 Crescimento, Manutenção e Preparo das Células para Experimentação.	28
3.3.3 Análise de Interação Celular.....	30
3.3.4 Análise de Viabilidade Celular.....	30
3.3.5 Análise de Proteína Total	31
3.3.6 Análise da Atividade de Fosfatase Alcalina	31
3.3.7 Análise de Quantificação de Nódulos de Mineralização	32
3.4 Análises de Formação de Biofilmes Monomicrobianos.....	33
3.4.1 Cepas e Meio de Cultura	33

3.4.2 Crescimento, Manutenção e Preparo dos Microorganismos para Experimentação	33
3.4.3 Viabilidade de Biofilmes Monomicrobianos.....	34
3.4.4 Análise da Interação de Biofilmes Monomicrobianos.....	35
3.5 Análise Estatística.....	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Caracterizações de Superfície.....	36
4.1.1 Química da Superfície	36
4.1.2 Rugosidade e Textura da Superfície.....	39
4.1.3 Molhabilidade da Superfície	43
4.1.4 Resistência a Corrosão da Superfície	45
4.2 Ensaios celulares <i>in vitro</i>	49
4.2.1 Interação Celular.....	49
4.2.2 Viabilidade Celular.....	50
4.2.3 Conteúdo de Proteína Total.....	51
4.2.4 Atividade de Fosfatase Alcalina	52
4.2.5 Quantificação de Nódulos de Mineralização	53
4.3 Formação de Biofilmes Microbianos	54
4.3.1 Viabilidade de Biofilmes Monomicrobianos.....	54
4.3.2 Interação de Biofilmes Monomicrobianos.....	58
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dimensão do corpo de prova do titânio grau IV após o processo de micro usinagem	20
Figura 2 - Diagrama esquemático do reator de implantação iônica por imersão em plasma	22
Figura 3 - Fotomicrografia por microscopia de fase invertida de células MG-63 utilizada nas análises celulares. (400x)	29
Figura 4 - Cultivo das cepas para as análises de formação de biofilmes microbianos	34
Figura 5 - Análises de superfícies por espectroscopia por energia dispersiva nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)	37
Figura 6 - Análises de superfícies por difração de raio-X nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)	38
Figura 7 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura dos grupos: Legenda. A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C. (1.000x)	39
Figura 8 - Análises de superfícies por perfilometria óptica nos grupos: Legenda. A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C...	40

Figura 9 - Análise da rugosidade média quadrática e área superficial, por perfilometria óptica nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C) 41

Figura 10 - Análises de superfícies por microscopia de força atômica (MFA-3D) nos grupos: Legenda. A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C..... 42

Figura 11 - Análises da rugosidade média quadrática e área superficial por MFA nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)..... 43

Figura 12 - Análises de molhabilidade da superfície nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)..... 44

Figura 13 - Ângulo de contato dos grupos: Legenda A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C. 44

Figura 14 - Módulo da impedância após 12 horas de imersão nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)..... 46

Figura 15 - Fase após 12 hrs de imersão nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)..... 47

Figura 16 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura dos grupos: Legenda. A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C. (15.000x)..... 48

Figura 17 - Fotomicrografia obtida por MEV da interação da linhagem MG-63 em superfície. Legenda. A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C (2.000x) 49

Figura 18 - Análise da viabilidade celular com os grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C).....	50
Figura 19 - Quantificação do conteúdo de proteína total com os grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C).....	51
Figura 20 - Atividade de fosfatase alcalina com os grupos (Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C).....	52
Figura 21 - Quantificação de nódulos de mineralização com os grupos (Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C).....	53
Figura 22 - Viabilidade de <i>P. aeruginosa</i> com os grupos (Controle, Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)	54
Figura 23 - Viabilidade de <i>S. aureus</i> com os grupos (Controle, Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)	55
Figura 24 - Viabilidade de <i>S. mutans</i> com os grupos (Controle, Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)	56
Figura 25 - Viabilidade de <i>C. albicans</i> com os grupos (Controle, Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)	57
Figura 26 - Fotomicrografia por MEV da interação de <i>S. mutans</i> em superfície. Legenda. A) Ti. B) Ti O-IIIP a 500°C. C) Ti O-IIIP a 600°C (10.000x).....	58

Tini ÍRP. Osteogênese e formação de biofilmes em superfícies de titânio submetidas ao tratamento de implantação iônica por imersão em plasma de oxigênio [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

Neste estudo foram caracterizadas superfícies de titânio (Ti) obtidas após utilização de diferentes temperaturas pela técnica de implantação iônica por imersão em plasma de oxigênio (O-IIIP), bem como correlacionado o efeito deste tratamento com a osteogênese e formação de biofilmes microbianos monotípicos. As amostras foram caracterizadas por meio de análises de química de superfície, rugosidade e textura da superfície, molhabilidade e resistência à corrosão. Além disso, análises de biocompatibilidade por meio de interação e viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e quantificação de nódulos de mineralização foram realizadas sobre a linhagem celular MG-63 (osteoblasto humano). Análise de formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* sobre as superfícies também foi realizada. Os dados foram estatisticamente analisados por teste ANOVA e Tukey ($p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$). Os resultados das análises de química de superfície demonstraram um aumento proporcional da quantidade de O conforme aumento da temperatura utilizada na técnica de O-IIIP, verificando ainda a presença de TiO_2 nos grupos tratados a 500°C e 600°C . Foi observado que, em escala nanométrica, houve um aumento significativo da rugosidade e da área superficial nas amostras tratadas com O-IIIP conforme aumento da temperatura utilizada, apresentando ainda, um aumento significativo da hidrofobicidade e resistência à corrosão nas amostras tratadas com O-IIIP. A análise de biocompatibilidade demonstrou aumento significativo em relação à viabilidade celular, produção de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização no grupo tratado com O-IIIP a 600°C , em relação aos demais grupos. Nas análises realizadas com biofilmes microbianos monotípicos foi verificada redução significativa de microorganismos, principalmente nos grupos submetidos ao tratamento com O-IIIP a 500°C e 600°C . Com isso, foi concluído que, as amostras submetidas à técnica O-IIIP apresentaram superfícies com variações químicas e físicas, as quais foram proporcionais ao aumento da temperatura utilizada no tratamento, sendo que o grupo tratado com temperatura mais elevada (600°C) demonstrou influência positiva na atividade e diferenciação celular, além de exibir redução na formação de biofilmes monomicrobianos.

Palavras-chave: Osteogênese. Biocompatibilidade. O-IIIP. Biofilme.

Tini ÍRP. Osteogenesis and biofilms formation on titanium surfaces submitted to ion implantation treatment by immersion in oxygen plasma [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

In this study, titanium surfaces were produced by the ion implantation technique, immersing samples in oxygen plasma (O-IIIP), at different temperatures. Therapeutic effects of the surface modification were evaluated for osteogenesis and formation of monotypic microbial biofilms. Roughness, texture, wettability, corrosion resistance and chemical composition of the samples were characterized. Moreover, biocompatibility of the produced materials was verified by cell interaction and viability, total protein content, alkaline phosphatase activity, and quantification of mineralization nodules assays were performed on MG-63 (human osteoblate) cells. Biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans and Candida albicans on surfaces was also evaluated. Data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey test. A proportional intensification in the amount of oxygen was observed as the temperature used in the O-IIIP technique raised, also, TiO₂ was observed in the groups treated at 500 °C and 600 °C. At nanoscale, there was a statistic increase in both roughness and surface area in samples treated with O-IIIP as a result of the increase of the temperature used. Hydrophobicity and corrosion resistance were also higher in samples treated with O-IIIP. According to the performed biocompatibility analyzes, cell viability, total protein production, alkaline phosphatase activity and the formation of mineralized nodules were stimulated and increased in the group treated with O-IIIP at 600 °C, compared to the other groups. In the assays performed with monotypic microbial biofilms, a statistic reduction of microorganisms was observed especially in the groups submitted to O-IIIP treatment at 500 °C and 600 °C. Therefore, we demonstrated here that O-IIIP technique was able to chemically and physically modify surfaces, and these modifications were proportional to the increase in temperature used in the treatment. Samples treated with the highest evaluated temperature (600°C) had a positive influence in cell activity and differentiation, and in reducing monomicrobial biofilms formation.

Keywords: Osteogenesis. Biocompatibility. O-IIIP. Biofilm.

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios das ciências médicas, tem sido realizada a reposição de órgãos ou tecidos perdidos pelos seres humanos, buscando a reabilitação e retorno à integralidade de formas e funções por meio de diversos artifícios possíveis, porém os resultados obtidos nem sempre supriram as necessidades individuais. Em 1950, os estudos em reposições ortopédicas tiveram grande impulso com a descoberta na Suécia, pelo Dr. Per-Ingvar Brånemark, do fenômeno da osseointegração e suas aplicações práticas, incentivando a pesquisa de biomateriais, principalmente a aplicação de materiais metálicos utilizados como implantes. Em 1969, Branemark divulgou o conceito de osseointegração como sendo a possibilidade de ancoragem direta da estrutura do implante no osso submetido à carga funcional sem que haja a presença de tecido conjuntivo fibroso nesta interface (Branemark et al., 1985).

O titânio (Ti) se destaca como material de interesse para ósseointegração devido às características tais como biocompatibilidade, alta trabalhabilidade, resistência a corrosão, alto módulo de elasticidade, facilidade de obtenção e custo (Sidambe, 2014). Os implantes de Ti podem permanecer em contato com tecidos orgânicos por longo período, além de suportar as mesmas cargas que os ossos circunjacentes. Sendo assim, é importante que o implante de Ti não apenas permitam a osseointegração, mas, que apresentem características mecânicas similares ao tecido ósseo. Apesar do titânio e suas ligas serem amplamente utilizados, ainda existem dúvidas quanto às características ideais das superfícies de implantes, para se obter uma rápida e mais adequada biofixação (Kohavi et al., 2013).

O Ti quando entra em contato com o ar atmosférico forma, na sua superfície, uma fina camada passivadora nativa de óxido de titânio altamente vantajosa para a biocompatibilidade (Yamagami et al., 2014), porém pode ser rapidamente destruída durante movimentação entre o implante e o tecido quando exposto a cargas (Mandl et al., 2001). Devido a este atrito, partículas de Ti podem ser depositadas localmente e, em seguida, transportadas para diversas partes do corpo, como gengiva, pulmão e baço, com possíveis sequelas posteriores (Mandl et al., 2001; Guglielmotti et al., 2015; Heringa et al., 2018).

Em longo prazo, a perda do implante é um grande problema, sendo necessário, diversas vezes, cirurgias de revisão de prótese. Nesse contexto, é importante avaliar as interações entre células osteoblásticas e o biomaterial. É ideal que essas células fiquem aderidas à superfície do implante, que se proliferem, diferenciam-se em osteoblastos e produzam matriz extracelular mineralizada, promovendo, assim, uma duradoura fixação do implante (Maik et al., 2008).

As propriedades de superfície, como composição química e topografia, desempenham uma atividade importante na regulação da resposta celular, podendo conduzir a uma osseointegração mais rápida (Qianli et al., 2016). Dentre as diferentes técnicas de tratamento superficial, no interesse de aprimorar a camada de TiO_2 e desenvolver uma nanotopografia adequada para a osseointegração, destaca-se a implantação iônica por imersão em plasma (3IP ou IIIP). O objetivo deste método é de melhorar as propriedades das superfícies de amostras com geometria complexa (Tian et al., 2000; Kostov et al., 2004).

A técnica de IIIP consiste, basicamente, em criar um plasma em uma câmara de vácuo com os íons que se deseja implantar. Estes íons são acelerados em direção à amostra por meio de uma diferença de potencial entre a peça e a câmara, via pulsador de alta tensão. Especificamente na técnica de IIIP de oxigênio (O-IIIP) em titânio, ocorre a formação de TiO_2 , que produzem diferentes espessuras de camada e rugosidades nanométricas em função da temperatura e tempo em que a exposição é realizada. A fase rutilo, caracterizada no TiO_2 , pode ser formada em altas temperaturas, sendo aquela a apresentar melhor biocompatibilidade quando comparada com a fase anatase, a qual é obtida a temperatura mais baixa (Anders, Pelletier, 2005).

Estudos têm demonstrado os benefícios de metais de Ti tratados com O-IIIP em relação à morfologia, composição e fase cristalina destes materiais (Munoz-Castro et al., 2009; Valência-Alvarado et al., 2010). O tratamento com O-IIIP também demonstrou melhora na osseointegração em fêmures de ratos, após três meses de incubação, quando comparado com implantes de Ti não submetidos a esse tratamento (Mandl et al., 2002, 2003). O Ti tratado com O-IIIP proporciona melhor adsorção de proteínas, bem como adesão, migração, proliferação, mineralização e diferenciação celular de hMSCs (células-tronco mesenquimais humanas), indicando que o tratamento apropriado com O-IIIP pode, portanto, tornar a superfície do Ti

mais biocompatível e melhorar a função de um implante dentário (Yang et al., 2015). No entanto, detalhes sobre os mecanismos subjacentes, que contribuem para o aumento da biocompatibilidade do Ti tratado com O-IIIP, ainda não foram elucidados.

Lavenus et al. (2012) verificaram as interações entre células-tronco mesenquimais humanas e a integração óssea de implantes de Ti nanoestruturado. Nanoporos de 20, 30 e 50 nm foram preparados por anodização, a qual consiste em uma técnica que se mistura ácido fluorídrico com ácido acético. As superfícies nanoestruturadas de 30 e 50 nm promoveram uma expressão gênica precoce para a diferenciação dos osteoblastos a partir de células mesenquimais sem suplementos osteogênicos. Adicionalmente, a osseointegração de implantes de Ti nanoestruturado e controle foram comparados pela implantação em tíbias de ratos no período de uma e três semanas. Estes achados demonstraram que as nanoestruturas controlaram a diferenciação de células, bem como a integração dos implantes. Sendo assim, foi concluído que estas superfícies de Ti nanoporosas podem ser de grande interesse para implantes dentários e ortopédicos.

El-wassefy et al. (2014) realizaram um estudo visando obter nanoestruturas na superfície dos implantes de titânio por processo de oxidação anódica com o objetivo de avaliar a bioatividade tanto *in vitro* como *in vivo*. Para isso, um protocolo econômico foi usado para aplicar descarga e faísca anódica criando nanoporosidades na superfície de Ti comercialmente puro. A investigação, *in vitro*, incluiu a morfologia, análise química da superfície, rugosidade e estrutura cristalina da película de TiO₂ preparado. A avaliação da bioatividade foi realizada por imersão dos espécimes em fluido similar ao corporal, observando a camada de superfície formada. A anodização de implantes de Ti produziu alterações morfológicas, elevaram o percentual de oxigênio na camada de TiO₂, aumentou a rugosidade da superfície dos implantes e, notavelmente, modificou a cristalinidade do filme. As avaliações *in vitro* mostraram que a bioatividade de uma camada de fosfato de cálcio foi precipitado sobre as superfícies do Ti após a imersão no fluido semelhante ao corporal. Os autores concluíram que superfícies nanoestruturadas de implantes de Ti podem ser preparadas por oxidação anódica, a qual promove osseointegração acelerada, que pode ser recomendada para o carregamento inicial.

Há uma grande demanda por implantes dentários com capacidade para acelerar a regeneração óssea perimplantar, sendo que as modificações de superfície micro e nanotopográficas revelaram afetar o metabolismo de células ósseas (Zuo et al., 2013). Estes autores utilizaram alta tecnologia de descarga em barreira dielétrica (DBD) para modificar a superfície de Ti comercialmente puro. Foi investigada a citotoxicidade da superfície DBD-Ti em comparação com superfícies usinadas e polidas. As placas de Ti exibiram diferentes energias de superfícies topográficas, nas escalas micro e nano. A superfície tratada com DBD-Ti puro aumentou significativamente a adesão e proliferação de células osteoblásticas (MC3T3-E1), comparadas com as superfícies de Ti usinada e polida, sugerindo uma melhor influência em comparação às outras duas superfícies. Adicionalmente, foi observado que a modificação DBD reforçou positivamente a adesão e a proliferação de pré-osteoblastos, sem efeitos negativos sobre a diferenciação celular.

Estudo realizado por Yang et al. (2010) indicaram que camadas de nanotubos de TiO_2 super-hidrofóbicas melhoraram a propriedade anticoagulante dos implantes, impedindo a adesão e ativação das plaquetas. Esses estudos determinaram, coletivamente, que o TiO_2 é um promissor revestimento de implante contendo sangue, determinando também que as interações entre o sangue e o Ti são reguladas, principalmente, pela energia, composição química e micro-nanotopografia da camada de TiO_2 .

As modificações na superfície baseadas em plasma são estratégias viáveis para melhorar as funcionalidades específicas da superfície, tais como resistência à corrosão e biocompatibilidade com sangue, permitindo que propriedades favoráveis sejam obtidas com a utilização dessa técnica (Wang et al., 2010). Pesquisas também demonstraram aumento na resposta óssea com a configuração nano+micro estruturas quando comparadas com micro apenas (sem nanoestruturas definidas) em humanos (Orsini et al., 2007; Goene et al., 2007) e ratos (Mendes et al., 2007).

Diversas características dos implantes, incluindo composição da superfície, topografia, hidrofobicidade, carga, microestrutura e rigidez são fatores que influenciam na aderência de microorganismos e formação de biofilme (Morais et al., 2013; do Prado et al., 2013). Infecções relacionadas a implantes continuam sendo preocupantes devido ao risco de infecção cirúrgica, que pode aumentar pela presença de um material estranho. Este tipo de infecção é difícil de ser tratada, uma

vez que os microorganismos arranjados em biofilme ficam protegidos da ação do sistema imune e de antimicrobianos, dificultando seu controle e eliminação (Zhao et al., 2015). A presença de cepas resistentes aos antimicrobianos no sítio cirúrgico ou área circundante coloca em risco a saúde do paciente. Além disso, essa colonização microbiana também pode interferir na osseointegração (Zhao et al., 2015; Zaatreh et al., 2016).

Estudos demonstraram que os patógenos bacterianos e seus produtos pró-inflamatórios, como o lipopolissacarídeo (LPS) desempenham um papel central na patogênese da peri-implantite e na falha de implantes (Gianelli et al., 2011). Em diversos estudos, foi mostrado que *S. aureus* é um dos patógenos mais comuns envolvidos na falha precoce de implantes dentários à medida que vai se conectando de forma mais eficiente a diversas superfícies de Ti (Shrestha et al., 2012; Thurnheer, Belibasakis, 2015).

O aumento do acúmulo de placa ao redor de implantes dentários está associado a dois principais patógenos: *S. mutans* e *Porphyromonas gingivalis*, colonizando aparelhos ortodônticos fixos (Cortelli et al., 2013), pois a colonização em maior extensão e a adesão microbiana dependem da energia livre da superfície e da rugosidade superficial dos implantes.

A eficiência bactericida de superfícies de Ti pode ser promovida pelo ajuste das características físicas nanopilares da superfície, como raios, altura e densidade das características (Michalska et al., 2018). Estudos desenvolvidos por Whitehead et al. (2005), afirmam que *P. aeruginosa* e *S. aureus* possuem capacidade de se ligarem a superfícies contendo poços regularmente espaçados de 1 e 2 μm (Whitehead et al., 2005)

Existem cerca de 611.000 espécies de fungos, sendo apenas 600 espécies consideradas patógenas aos humanos e, destacando *C. albicans*, que nos Estados Unidos é considerada a quarta causa mais frequentemente encontrada em infecções sistêmicas adquiridas em hospitais (Pfaller, Diekema, 2010; Mayer, et al., 2013). Essa espécie é responsável por infecções profundas nos tecidos e nas mucosas, especialmente na cavidade bucal, sendo provado que até 50% das infecções por essa espécie relacionadas ao hospital são mortais (Mayer, et al., 2013). Recentemente diversas pesquisas tentaram elucidar a complexidade da microbiota oral associada à integração bem-sucedida de implantes dentários e tecidos moles

peri-implantar, o que foi associado à presença de cocos Gram-positivos e Gram-negativos (Charalampakis, Belibasakis, 2015).

Embora estudos atuais, como citados anteriormente, reportem a influência positiva de superfícies nanotexturizadas sobre a atividade osteoblástica e antimicrobiana, há poucos relatos na literatura sobre o efeito da técnica O-IIIP sobre a biocompatibilidade de amostras de Ti e influência na formação de biofilme microbiano.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral neste estudo foi analisar os dados da osteogênese e da formação de biofilme monotípico, *in vitro*, sobre superfícies de Ti obtidas por meio da técnica de implantação iônica por imersão em plasma de oxigênio (O-IIIP), utilizando diferentes temperaturas.

Os objetivos específicos foram:

- a) caracterizar, micro e nanoestruturalmente, as superfícies de Ti grau IV, após tratamento com O-IIIP;
- b) analisar, morfológicamente, a interação de MG-63 com as amostras de Ti pré e pós-tratadas;
- c) avaliar e quantificar a viabilidade, o nível de proteína total, a atividade da fosfatase alcalina e a formação de nódulos de mineralização de MG-63 após interação com as amostras pré e pós-tratadas;
- d) avaliar a formação de biofilmes monomicrobianos de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans* sobre as amostras pré e pós-tratadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Amostras de Ti

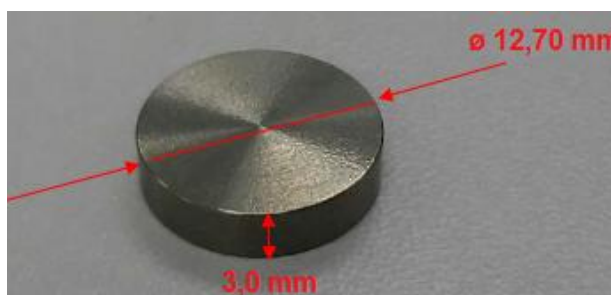
Uma barra cilíndrica ($\varnothing$ 12,7 mm) de Ti grau IV, atendendo os parâmetros da *American Society for Testing and Materials (ASTM F67)* e ISO 5832-2, com composição química conforme especificada da Tabela 1, foi micro usinada em corpos de prova (CDP) de 3 mm de espessura (Figura 1). O certificado de qualidade emitido pelo fornecedor Sandinox encontra-se no ANEXO A.

Tabela 1 - Especificação de composição química do Ti grau IV, conforme ASTM F67 – 13 e ISO 5832-2

Elemento Químico	Nitrogênio	Carbono	Hidrogênio	Ferro	Oxigênio	Titânio
ASTM F67 (%) (máx.)	0,05	0,10	0,015	0,05	0,40	Base
CQ (%)	0,006	0,038	0,0018	0,16	0,33	Base

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1 – Dimensão do corpo de prova do titânio grau IV após o processo de micro usinagem



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1.2 Micro Usinagem

Os corpos de prova (CDP) foram confeccionados na empresa Titaniumfix (São José dos Campos, SP, Brasil) por um torno multitarefa comando numérico computadorizado (CNC) (Traub, modelo TNL2, Sorocaba, SP, Brasil). Foi utilizado o sistema de usinagem (Mitsubishi Eletric, modelo TX8i, Brasil). Este equipamento possibilita a realização de operações simultâneas de fresamento e torneamento.

Os parâmetros utilizados para a usinagem dos CDP foram definidos de acordo com Davis e Semiatin (1993), os quais são indicados para usinagem do Ti comercial puro, utilizando ferramentas de metal duro, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros para usinagem do Ti

Parâmetros	Valores
Velocidade do corte (Vc)	134 m/min
Avanço	0,02 mm/rot
Profundidade de corte (Ap)	0,05 mm

Fonte: Davis e Semiatin, 1993.

3.1.3 Lavagem Primária

Para este processo foram removidas impurezas provenientes do processo de micro usinagem, tais como graxas, lubrificantes, cavacos e demais contaminantes, por meio de um sistema de vibração ultrassônica produzido por uma vibração de alta frequência.

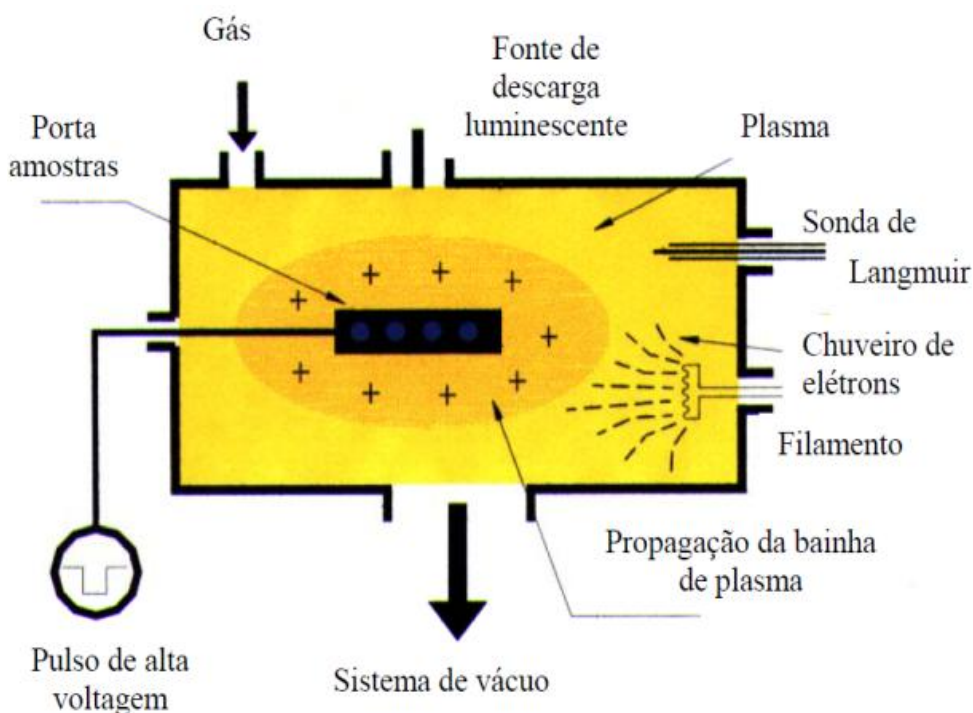
As amostras de Ti foram submetidas ao banho ultrassônico (Alt, modelo Altsonic Clean 3PA, série 62107, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com acetona por 20 min

à temperatura ambiente. Após essa etapa, as amostras foram secas e armazenadas em temperatura ambiente até a próxima etapa tratamento.

3.1.4 Tratamento das Amostras por O-IIIP

O tratamento das amostras foi realizado em um reator de implantação iônica por imersão em plasma, em parceria com o Laboratório Associado a Plasma (LAP) - Instituto de Pesquisas Espaciais (INPE) – São Jose dos Campos, SP. O diagrama esquemático do sistema pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Diagrama esquemático do reator de implantação iônica por imersão em plasma



Fonte: Reis, 2015.

A partir da realização do tratamento de implantação iônica por imersão em plasma de oxigênio (O-IIIP) nas superfícies de Ti grau IV, foram produzidas três

diferentes amostras (pós-tratamento) em condições semelhantes, porém com diferentes temperaturas (Tabela 3), sendo Grupo 1: Ti O-IIIP a 400°C; Grupo 2: Ti O-IIIP a 500°C; e Grupo 3: Ti O-IIIP a 600°C. Os dados avaliados foram comparados com o grupo Ti (pré-tratamento).

Tabela 3 – Parâmetros operacionais adotados em cada tratamento

Condições de tratamento	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Pressão do trabalho (Torr)	6×10^{-3}	6×10^{-3}	6×10^{-3}
Tensão (kV)	7,7	7,7	7,7
Corrente (A)	0,45	0,45	0,45
Pulso (μs)	30	30	30
Frequência (Hz)	420	420	420
Fluxo de oxigênio (sccm)	13	13	13
Tempo (h)	1	1	1
Temperatura (°C)	400	500	600

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Caracterização das Amostras

3.2.1 Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV/EDS)

Foi realizada análise qualitativa (morfológicas) e quantitativa das superfícies das amostras pré e pós-tratadas com O-IIIP a partir de imagens obtidas por MEV (FEI, modelo Inspect S50), acoplada a sonda EDS (*Energy dispersive X-ray spectrometry*) (Bruker, modelo XFlash Detector 410-M).

Foram analisadas textura, heterogeneidade e microfissuras, além de realização de quantificação do volume de massa atômica de O presente nas superfícies, utilizando um $n=05$ amostras por grupo. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Materiais Odontológicos e Prótese do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) – Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) – São José dos Campos, SP, Brasil.

3.2.2 Análises por Perfilometria Óptica

Essa técnica tem como função de mostrar a topografia de um material em três dimensões (3D), permitindo sua classificação conforme o aspecto de sua superfície. A perfilometria óptica também permite quantificar a rugosidade da superfície por detecção do conjunto de picos e vales microgeométricos caracterizados pelas saliências e reentrâncias presentes em uma superfície. Esta análise micrométrica quantitativa permite calcular as rugosidades médias (R_a), média quadrática (R_q), parcial (R_z) e total (R_t).

Os resultados deste estudo foram reportados apenas em R_q , que é definido como a raiz quadrada da média dos quadrados das amplitudes do perfil em relação à linha média, resultando em uma média do desvio padrão dos dados analisados. Para tanto, foi utilizado um perfilômetro (Veeco, modelo WYKO NT1100, Tucson, AZ, EUA) no modo Vertical scanning-interferometry (VSI), na qual as rugosidades superficiais das amostras (pré e pós-tratamento) foram determinadas calculando uma média de $n=05$ de amostras por grupo, com área de $229,2 \mu\text{m} \times 301,3 \mu\text{m}$, apresentando a média e o desvio padrão dos valores obtidos. Este experimento foi realizado no Laboratório de Medidas Tribológicas e Propriedades Mecânicas – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) – São José dos Campos, SP, Brasil.

3.2.3 Análises por Microscopia de Força Atômica (MFA)

Esta técnica permite, em escala nanométrica, avaliar superfícies de materiais em níveis atômico e moleculares, gerando um mapa topográfico, o qual fornece as propriedades de superfície (rugosidade) e características do material analisado. Para tanto, foi utilizado um microscópio de força atômica (Veeco, modelo MULTIMODE V, Tucson, AZ, EUA) para observação da topografia dos CDP, sendo avaliados pelo modo de contato intermitente, com ponta de SiN_3 (Nanoworld - modelo NCHR, Neuchâtel, Suíça) - Silicon tip - ressonância 320 kHz - constante de força 42N/m, numa área de $2 \times 2 \mu\text{m}$ em cada amostra, utilizando o sistema *Flex-Axiom* MFA, disponibilizado pelo Laboratório de Medidas Tribológicas e Propriedades Mecânicas – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) - São José dos Campos, SP, Brasil.

3.2.4 Análises por Difração de Raios X (DRX)

Esta técnica foi utilizada para determinação de estrutura cristalina das amostras. O tamanho e a geometria da célula unitária podem ser analisados a partir de posições angulares dos picos de difração, enquanto o arranjo dos átomos dentro da célula unitária está associado às intensidades relativas dos picos. Portanto, com esta análise, foi verificado se houve a formação de TiO_2 cristalino, além de indicar qual a fase formada. Para as análises de DRX das amostras, antes e após os tratamentos de O-IIIP, foi utilizado um difratômetro (Panalytical, modelo X' PERT POWER, Almelo, EA, Holanda), utilizando uma fonte de radiação $\text{CuK } \alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). O intervalo angular em 2θ utilizado foi de 35° a 90° . As medições foram realizadas à temperatura ambiente em modo contínuo de varredura, com velocidade de $1,2^\circ/\text{min}$ e passo angular de $0,02^\circ$. A tensão e corrente utilizadas foram de 45 kV e 40 mA, respectivamente. Os dados obtidos em arquivos de extensão (.xrdml e .raw) foram tratados utilizando-se o programa X'Pert Highscore, versão 3.0a, fornecido pela PANalytical B.V. Este programa detectou, identificou e ajustou

automaticamente os picos encontrados por DRX em relação a um banco de dados de fichas JCPDS. Este experimento foi realizado no Laboratório de Difração de Raios X – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – São José dos Campos, SP, Brasil.

3.2.5 Análise da Molhabilidade de Superfície

Esta análise foi realizada em um goniômetro de ângulo de contato (Biolin Scientific, modelo Theta Lite, Hångpilsgatan, Göteborg, Suécia), o qual atuou por meio de um balanço entre forças adesivas entre sólido/líquido e coesivas do líquido, resultante no ângulo de contato. O equipamento foi disponibilizado pelo Laboratório de Bioengenharia – Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) – Universidade Estadual de São Paula (UNESP) – São Jose dos Campos, SP, Brasil. Para tal experimento, foram utilizadas n=05 amostras por grupo, sendo utilizada água destilada como líquido para formação de gota.

3.2.6 Análises por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A resistência à corrosão das amostras e efeitos dos tratamentos foram avaliadas por EIE. Para tanto, foi utilizado, para os testes eletroquímicos, o eletrodo de Ag/AgCl - como referência – e, como contra eletrodo, um fio de platina (99,99%). Os testes foram realizados em solução artificial de fluido corpóreo (SBF – *simulated body fluid*), com composição química e concentrações conforme a tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações dos reagentes para solução de SBF

Reagentes	Concentrações
NaCl	8 g/l (146,7 mM)
MgCl₂	0,30 g/l (1,54 mM)
CaCl₂.2H₂O	0,368 g/l (2,5 mM)
Na₂HPO₄.2H₂O	0,178 g/l (1,0 mM)
NaHCO₃	0,352 g/l (4,2 mM)

Fonte: Elaborada pelo autor.

As análises de EIE foram realizadas com amplitude de sinal de perturbação de 10 mV, no intervalo de 10^5 a 10^{-2} Hz. As medidas foram realizadas com os tempos de submersão de 0, 2, 4, 8, 12 hrs, sendo utilizado no presente estudo amostra com 12 hrs de submersão. Para as análises, foi utilizado o equipamento Autolab (Metrohm, 302N, São Paulo, SP, Brasil), disponibilizado pelo Laboratório de Caracterização Físico-Química, do Instituto de Ciência e Tecnologia – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – São José dos Campos, SP, Brasil.

Para verificação de possíveis alterações microestruturais nas superfícies, decorrentes do ensaio de corrosão, as medidas eletroquímicas das amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (FEI, modelo Inspect S50), disponibilizado pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – São José dos Campos, SP, Brasil.

3.3 Análises Celulares *in vitro*

3.3.1 Linhagem Celular e Meio de Cultura

Todos os passos referentes à cultura celular foram realizados no Laboratório de Estudo Interdisciplinar em Células (LEIC), do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP – São José dos Campos – SP.

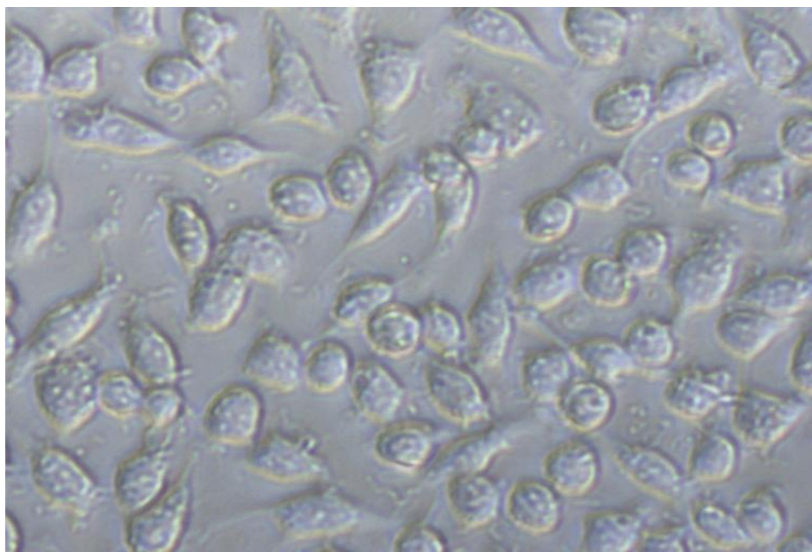
Para os experimentos realizados foi utilizada a linhagem celular de Osteoblastos Humano (MG-63), provenientes do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil).

As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) (Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab, Campinas, Brasil), penicilina-estreptomicina (100 µg/mL) (Cultilab, Campinas, Brasil).

3.3.2 Crescimento, Manutenção e Preparo das Células para Experimentação

As células foram descongeladas, centrifugadas (3.000 rpm/5min) e cultivadas em frascos de cultura celular (*TPP Techno Plastic Products, Trasadigen, Switzerland*) de 250 mL e 75 cm² em estufa incubadora (SANYO Eletric Co., Ltd MODEL MCO-19AIC) com controle automático de temperatura de 37°C e atmosférica contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48 hrs e, o desenvolvimento das células, avaliado por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany) até que as células atingissem a confluência, caracterizada pela ocupação de mais de 80% do frasco (Figura 3).

Figura 3 – Fotomicrografia por microscopia de fase invertida de células MG-63 utilizada nas análises celulares. (400x)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o subcultivo celular foi utilizado o processo de tripsinização, redistribuindo em novas garrafas de cultura. Nesse processo, a tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) foi acrescentada, durante 2 min, para o desprendimento das células. As células foram transferidas em tubo Falcon (*TPP Techno Plastic Products, Trasadigen, Switzerland*), sendo adicionado meio DMEM e centrifugadas 3000 rpm/5min a 25°C (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, USA). Por fim o sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em DMEM, sendo redistribuídos em novas garrafas de cultura celular.

Para a realização dos experimentos, as células foram transferidas para microplacas de cultura (Greiner, Bio-one, Brasil) de 24 poços. Previamente a essa transferência ocorreram os processos de tripsinização, centrifugação, ressuspensão do precipitado de células e contagem em câmara de *Neubauer* (Prolab, São Paulo, Brasil). Para o plaqueamento, 2×10^4 células viáveis foram adicionadas em cada poço, sendo complementado com DMEM suplementado, apresentando um volume final de 1 mL por poço. Após esse processo, as células foram incubadas (37°C e CO₂ 5%) por 24 h, para aderência.

3.3.3 Análise de Interação Celular

Após três dias de cultivo, esta interação foi avaliada por MEV, utilizando n=02 para cada grupo experimental. Para remoção de células não aderentes, as amostras foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e fixadas com paraformaldeído (4%) por 20 min à temperatura ambiente. As células foram desidratadas por meio de uma série ascendente de etanol (70%, 90% e 100%) por 10 min cada. Posteriormente as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro, utilizando um sistema sputter-revestimento (Emitech, modelo SC7620). O equipamento utilizado foi o modelo Inspect S50 da marca FEI (*Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA*), disponibilizado pelo Laboratório de Pesquisa Materiais Odontológicos e Prótese – Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP – São José dos Campos, SP, Brasil.

3.3.4 Análise de Viabilidade Celular

Após três dias de exposição, a viabilidade celular foi analisada utilizando o corante 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*), a 0,5 mg/mL. Este corante reage com desidrogenases celulares apenas de células viáveis. Após 1 h de incubação (37°C e CO₂ 5%), foi acrescentado o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*) para solubilização dos cristais de formazan. Para cada grupo experimental foi utilizado n=05. Em seguida, o conteúdo foi transferido em microplacas de cultura (Greiner, Bio-one, Brasil) de 96 poços e submetido a um leitor de medida colorimétrica de microplaca (Biotek, modelo ELx808cse) no comprimento de onda 570 nm. Os dados foram aferidos como absorbância.

3.3.5 Análise de Proteína Total

Após dez dias de exposição, foi avaliado o conteúdo de proteína total, de acordo com o método modificado de Lowry *et al.* (1951). Para tanto, também foi utilizado n=05. Inicialmente, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com PBS e preenchidos com lauril sulfato de sódio (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*) a 0,1%. Após, a solução de cada poço foi misturada com o reagente de Lowry (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*), deixando à temperatura ambiente por 20 min. Em seguida foi acrescentado o reagente Folin - Ciocalteau (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA*) que, pelo complexo de ligação peptídica, é responsável por causar uma mudança na coloração da solução para azul. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, foi utilizado um espectrofotômetro (Micronal, modelo AJX 1900) a 680 nm para cálculo da absorbância. O nível de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em µg/ml.

3.3.6 Análise da Atividade de Fosfatase Alcalina

Após dez dias de exposição, foi realizada análise da atividade de fosfatase alcalina, sendo utilizado n=05 por cada grupo experimental. Este experimento foi realizado com os mesmos lisados utilizados para quantificar o nível de proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica). Foram acrescentados, em tubos de vidro, os substratos timolftaleína monofosfato e tampão dietanolamina (0,3 M e pH 10,1). A essa solução, foi acrescentada uma alíquota de 200 µl dos lisados de cada grupo, permanecendo aquecidos a 37°C em banho-maria, por um período de 10 minutos. Para o desenvolvimento da coloração, foram adicionadas soluções de Na₂CO₃ (0,09 M) e NaOH (0,25 M). A absorbância foi dada em um espectrofotômetro (Micronal, modelo AJX 1900) a 590 nm. A atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir

de curva-padrão usando timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 μmol de timolftaleína/hora/ μg proteína.

3.3.7 Análise de Quantificação de Nódulos de Mineralização

Após quatorze dias de exposição, foi analisada a quantificação de nódulos de mineralização, utilizando, para cada grupo experimental, uma quantidade de amostras de $n=05$. Após a remoção do meio de cultura, foi acrescentada, em cada poço, solução de Hank's (H6136 - Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), responsável por agir como solução nutritiva em cultivo celular. Após esse processo, foi utilizado álcool (70%) para desidratação das células, as quais foram encubadas por 1 h. Após, as células foram lavadas com água destilada e acrescentado o corante vermelho de Alizarina S (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) a 2 mg/mL, responsável por corar áreas ricas em cálcio, por 15 min. Por fim, as células foram lavadas com água destilada e PBS e mantidas à temperatura ambiente, para secagem completa das amostras.

Após vinte e quatro hrs, foi acrescentado aos poços, ácido acético (10%) e mantidos em temperatura ambiente por 30 min, sob agitação. O conteúdo foi transferido para microtubos (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) agitado em vórtex (Vórtex, modelo QL 901) por 30 s. Os microtubos foram aquecidos em banho-maria a 85°C por 10 min e, posteriormente, transferidos para um recipiente com gelo por 5 min. Após, foi realizada centrifugação (Eppendorf, modelo CENTRIFUGE 5424 R) e, os sobrenadantes presentes nos microtubulos, foram transferidos para placa de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA). Foi acrescentado hidróxido de amônia (10%), em cada poço, para o processo de neutralização do ácido. Por fim, a leitura foi realizada em leitor de microplaca (Biotek, modelo ELx808 IU), a 405 nm.

3.4 Análises de Formação de Biofilmes Monomicrobianos

3.4.1 Cepas e Meio de Cultura

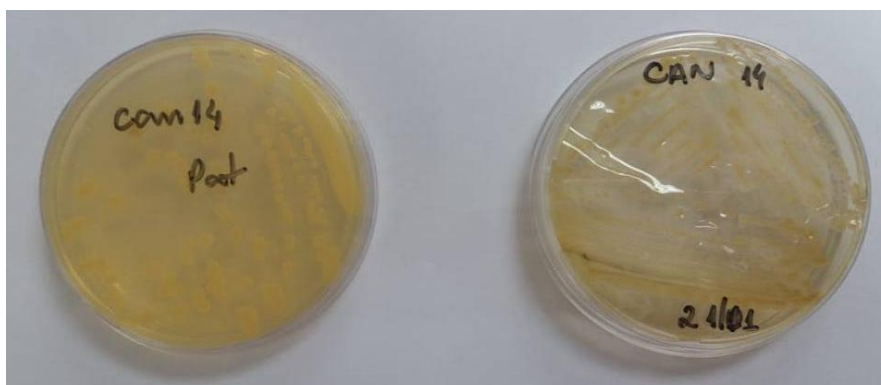
Foram utilizadas cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. mutans* (ATCC 35688) e *C. albicans* (ATCC 18804), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (ICT – UNESP), São José dos Campos, SP.

Foi utilizado o caldo *Brain heart infusion* (BHI) (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) para cultivo dos microorganismos. Para *S. mutans* foi utilizado o caldo BHI sacarosado (5%).

3.4.2 Crescimento, Manutenção e Preparo dos Microorganismos para Experimentação

As cepas foram cultivadas em placas de Petri (OLEN, modelo K30 - 90150), como mostrado na Figura 4, utilizando caldo BHI e, posteriormente, em meio BHI a 37°C por 24 hrs cada. Para *S. mutans*, a incubação foi realizada com 5% de CO₂. Em seguida, cada caldo foi centrifugado (2000 rpm/10 min), o sobrenadante descartado, e o pellet suspenso em solução fisiológica – NaCl 0,9%, padronizadas a 10⁶ de UFC/mL em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil), de acordo com o comprimento de onda e densidade óptica de cada microorganismo.

Figura 4 – Cultivo das cepas para as análises de formação de biofilmes microbianos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para formação dos biofilmes monomicrobianos de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*, as amostras foram distribuídas em poços de microplacas (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) de 24 poços, sendo n=05 por grupo experimental (Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C), além do grupo controle (poço sem amostra). Em seguida, foram adicionados 1 mL/poço de cada suspensão microbiana padronizada em meio de cultura (BHI ou BHI sacarosado). Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 hrs.

3.4.3 Viabilidade de Biofilmes Monomicrobianos

Após vinte e quatro hrs de incubação, o meio de cultura foi removido e as amostras lavadas com solução fisiológica estéril, a fim de eliminar as células não aderidas ao biofilme. Em seguida foi adicionado a solução de MTT a 0,5 mg/ml. Após 1 h de incubação, sob proteção da luz, esta solução foi removida e, adicionado DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), permanecendo em agitação em mesa orbital por 10 min. Foram transferidas, para placa de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA), alíquotas de 100 µL de cada poço e realizada leitura da absorbância em um leitor de microplacas (Biotek, modelo ELx808cse), a 570 nm.

3.4.4 Análise da Interação de Biofilmes Monomicrobianos

Após vinte e quatro hrs de incubação, o meio de cultura foi removido e as amostras lavadas com solução fisiológica estéril. Para desidratação dos microorganismos foi utilizada uma série ascendente de etanol (70%, 90% e 100%) e, previamente a análise, todas as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro, utilizando um sistema sputter-revestimento (Emitech, modelo SC7620). O equipamento utilizado foi o modelo Inspect S50 da marca FEI (*Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA*), disponibilizado pelo Laboratório de Pesquisa Materiais Odontológicos e Prótese do Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP– São José dos Campos, SP.

3.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados, estatisticamente, por ANOVA um fator e comparação múltipla de *Tukey*, utilizando software *GraphPad Prism 6.0*. Os níveis de significância adotados foram de 5%, 0,1% e/ou 0,001%.

4 RESULTADOS

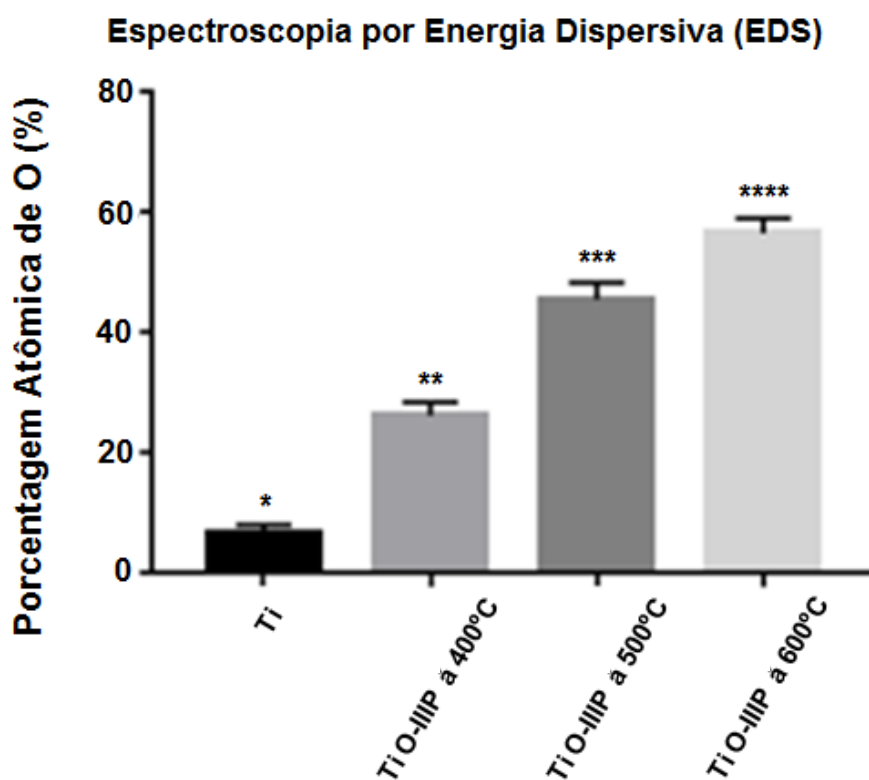
Neste capítulo são evidenciados todos os resultados decorrentes da metodologia aplicada neste trabalho organizados em: Caracterização de superfície, por meio de análises de química de superfície (EDS e DRX), rugosidade e textura (MEV, perfilometria óptica e MFA), molhabilidade (ângulo de contato) e resistência a corrosão (EIE), bem como ensaios celulares *in vitro*, por meio de interação celular, viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e quantificação de nódulos de mineralização, utilizando a linhagem celular MG-63 (Osteoblasto humano), e ensaios de formação de biofilmes monomicrobianos, por meio da viabilidade e interação de biofilmes monomicrobianos.

4.1 Caracterizações de Superfície

4.1.1 Química da Superfície

A análise química da superfície realizada por espectroscopia por EDS para quantificar a quantidade de O presente na superfície pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Análises de superfícies por espectroscopia por energia dispersiva nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



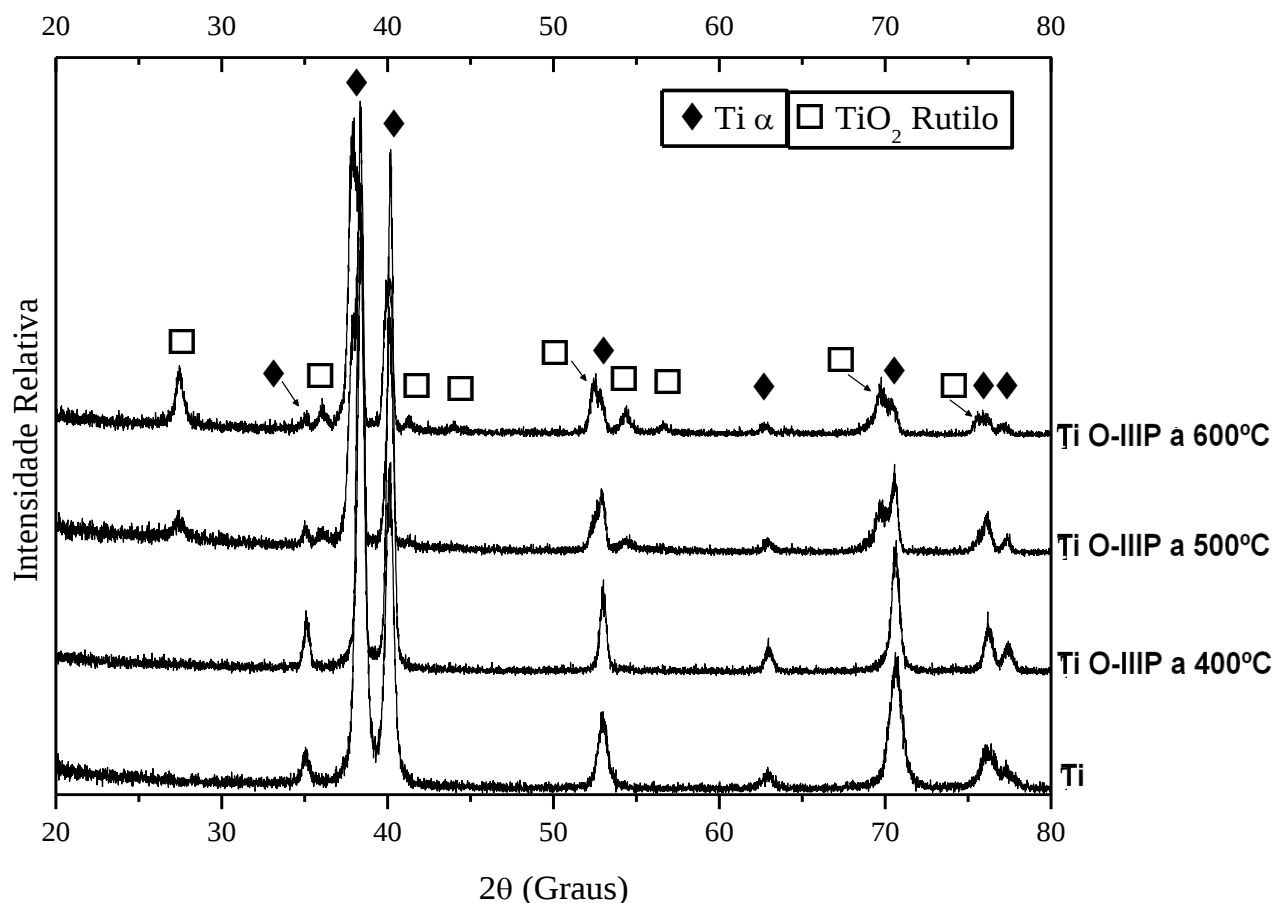
Legenda: Espectroscopia por energia dispersiva. **p < 0,05, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001 em relação ao grupo Ti* (ANOVA e Tukey test).

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com a Figura 5, o grupo Ti apresentou uma baixa quantidade de O em sua superfície (média de 6,94% O), já os grupos de Ti tratados com O-IIIP a 400°C, 500°C e 600°C apresentaram os valores médios de O de 26,31%, 45,66% e 56,61%, respectivamente, demonstrando que, quanto maior a temperatura utilizada no tratamento, maior a porcentagem atômica de O implantado na superfície.

A Figura 6 apresenta os resultados analisados por meio da técnica de DRX, a fim de detectar uma possível presença de TiO₂ cristalino nas amostras tratadas.

Figura 6 – Análises de superfícies por difração de raio-X nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



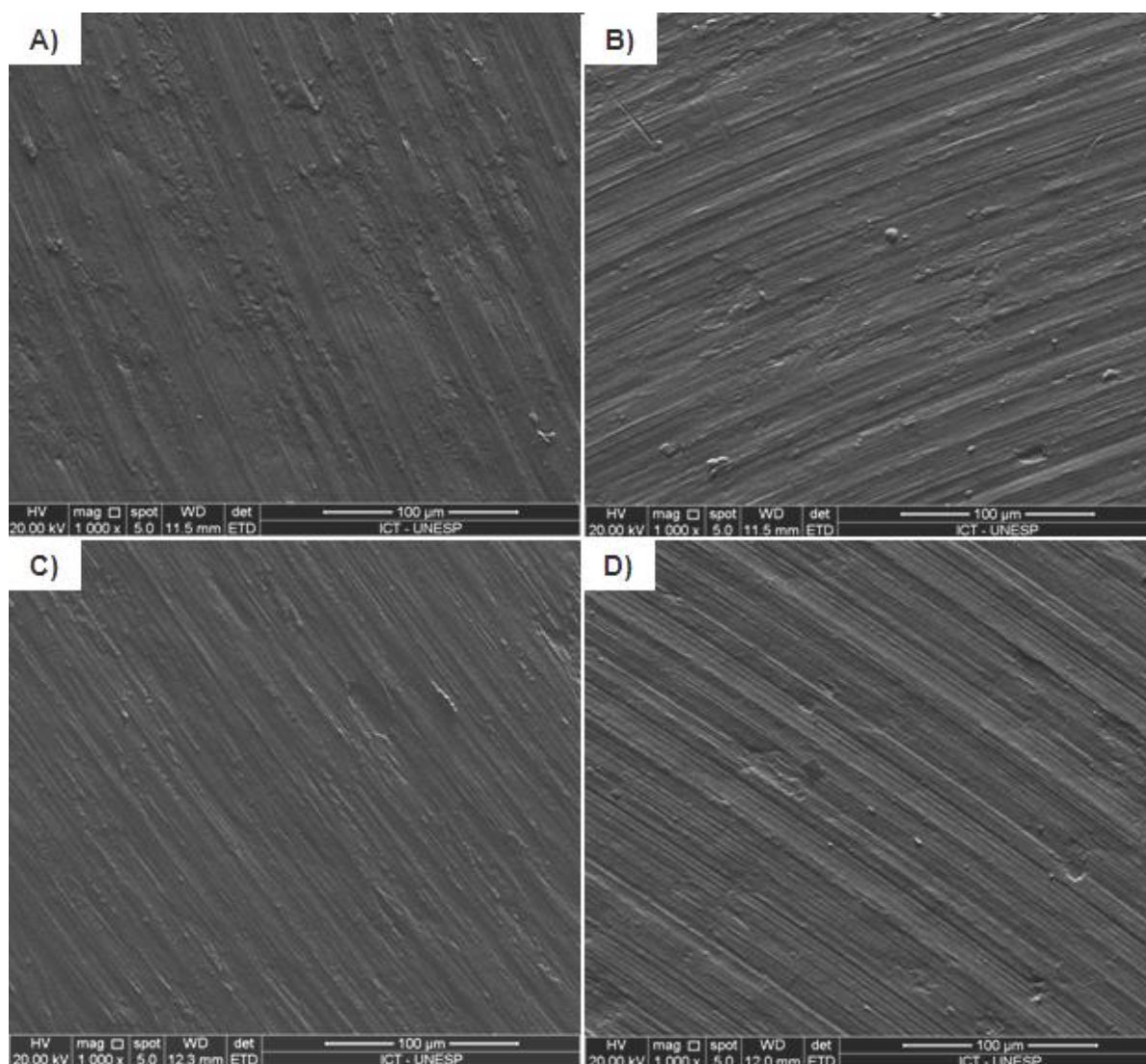
Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 6 indica a presença de picos de TiO_2 (fase rutilo) nos grupos tratados com O-IIIP a 500°C e 600°C, caracterizados, principalmente, no ângulo de 27,5°, com o pico de maior intensidade desta fase. A presença desses picos não foi identificada nos grupos Ti e Ti O-IIIP a 400°C. Conforme apresentado na Figura 6, a proporção estequiométrica do O em relação ao Ti vai aumentando conforme aumento da temperatura utilizada no tratamento, o que propicia a formação do TiO_2 (fase rutilo). As análises das amostras também indicam a presença de Ti- α em todos os grupos.

4.1.2 Rugosidade e Textura da Superfície

A avaliação morfológica das superfícies das amostras pré e pós-tratamento com O-IIIP foram observadas por meio de análise por microscopia MEV a fim de verificar se houve alterações de textura, heterogeneidade ou microfissuras, como indica a Figura 7.

Figura 7 – Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura dos grupos

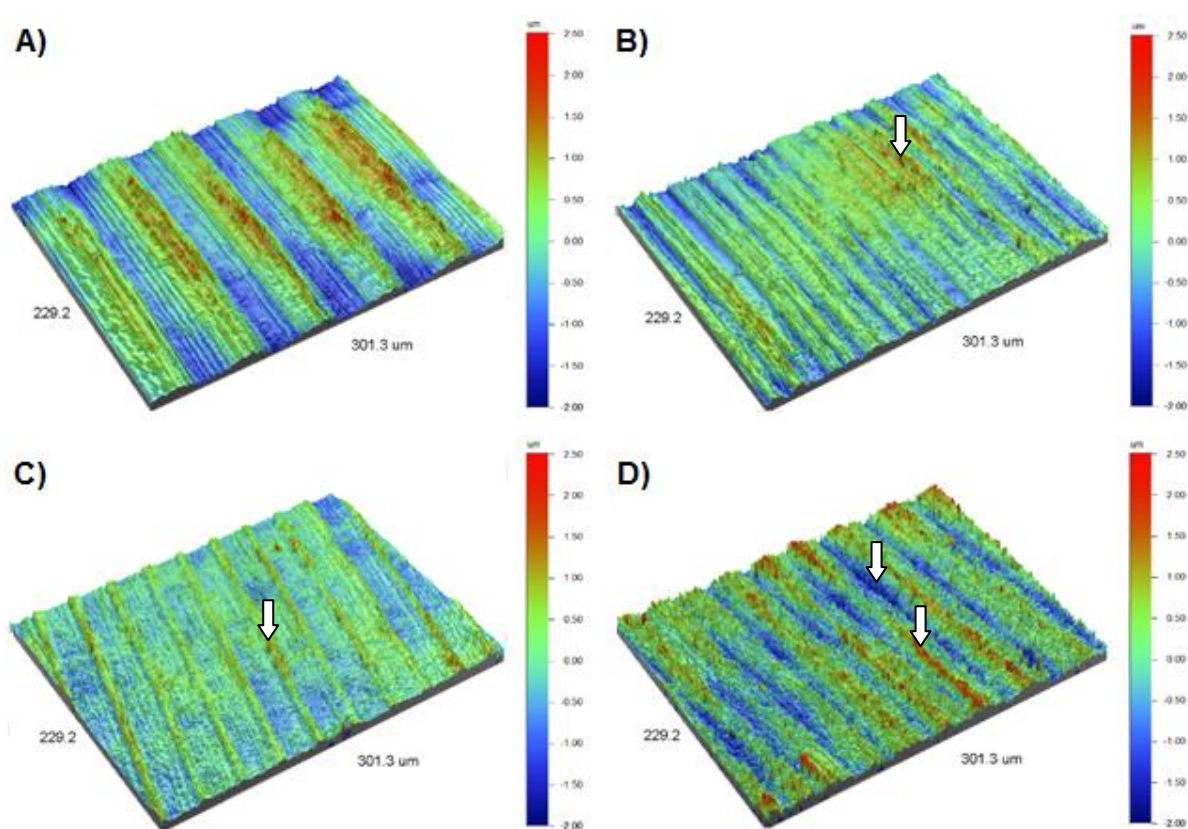


Legenda: A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C. (1.000x)
 Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 7 demonstra áreas demarcadas devido ao processo de usinagem, porém não foi observada nenhuma variação evidente na textura, heterogeneidade ou microfissuras nas superfícies ocasionadas pelo tratamento com O-IIIP.

A topografia da superfície das amostras pré e pós-tratamento com O-IIIP foi analisada (qualitativamente e quantitativamente) pela técnica de perfilometria óptica, conforme indicam as Figuras 8 e 9, respectivamente.

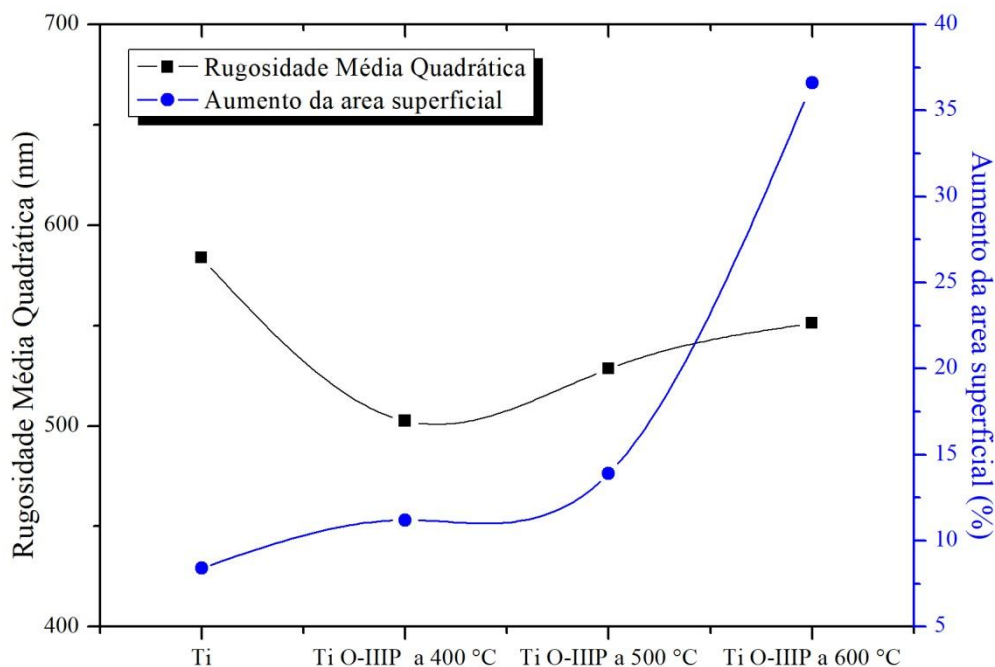
Figura 8 – Análises de superfícies por perfilometria óptica nos grupos



Legenda: A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C. Setas: Presença de grânulos devido ao tratamento O-IIIP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9 – Análise da rugosidade média quadrática e área superficial por perfilometria óptica nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)

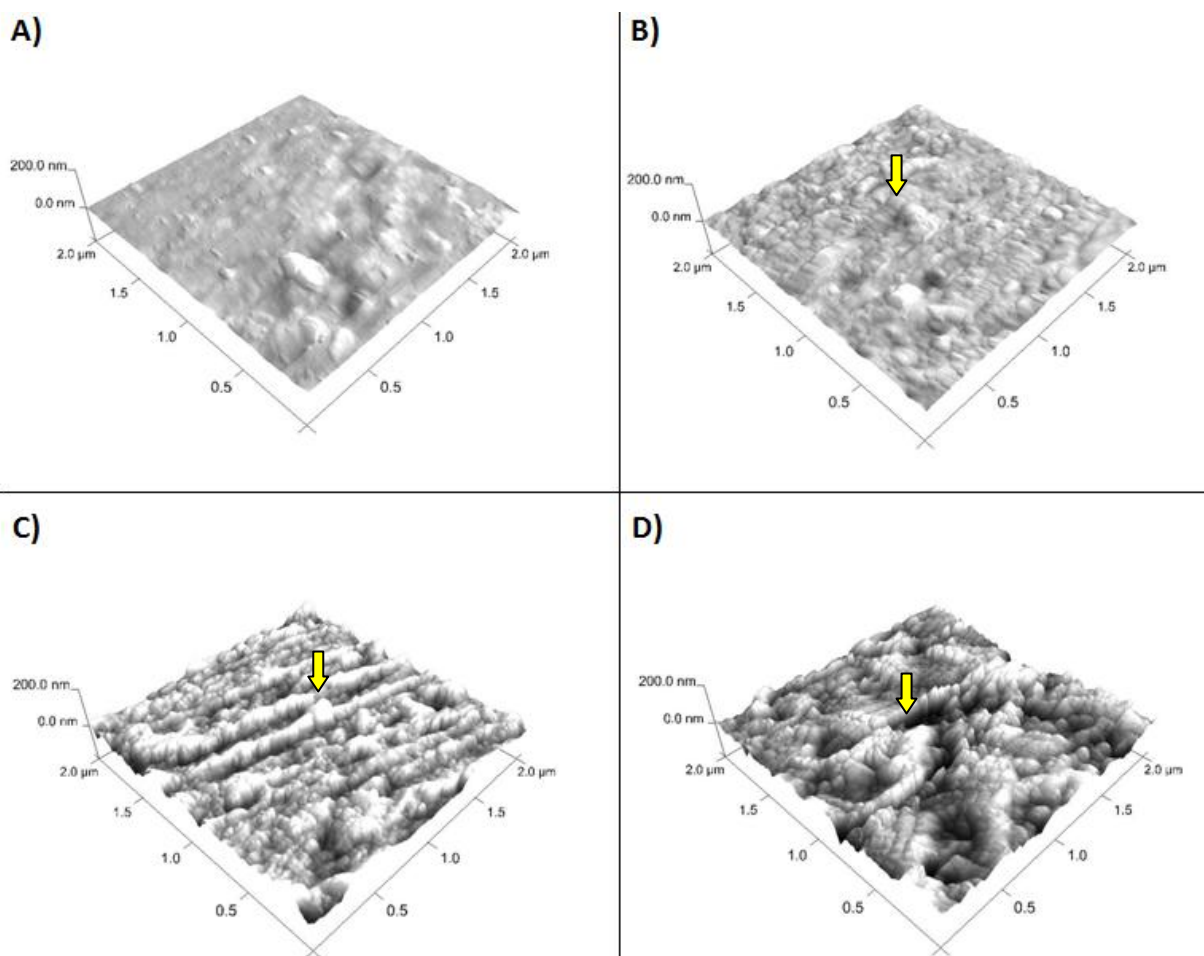


Fonte: Elaborada pelo autor.

A rugosidade média quadrática (R_q) apresentou variação, nas amostras pré e pós-tratamento, entre as faixas de 502 a 583 nm, conforme apresentado na Figura 9. Por outro lado, houve um incremento significativo do aumento de área superficial após os tratamentos, chegando até 36% de aumento para o tratamento com O-IIIP a 600°C. Qualitativamente, as imagens apresentadas pela Figura 8 corroboram com este resultado de aumento da área de superfície, visto ser possível visualizar o aumento da formação de grãos, de acordo com o aumento da temperatura de tratamento, nas regiões de depressão da usinagem, demonstradas pelas setas.

Para confirmar tal alteração nanométrica, foi realizada análise por MFA (Figura 10), que evidencia essa mudança de textura e rugosidade em escala nanométrica, qualitativamente e quantitativamente.

Figura 10 – Análises de superfícies por microscopia de força atômica (MFA-3D) nos grupos

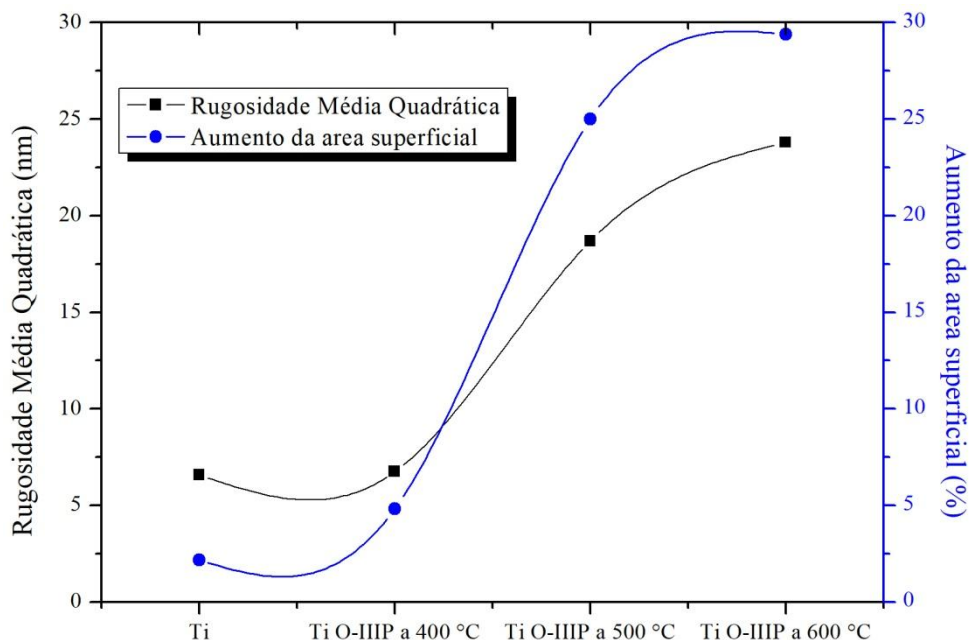


Legenda: A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C. Setas: Presença de grânulos devido ao tratamento O-IIIP.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O Ti exibiu superfícies relativamente planas com traços de marcas de usinagem, como mostrado na Figura 10 (A). As amostras tratadas com O-IIIP exibiram uma estrutura superficial microscopicamente nanoporosa, apresentando uma camada de TiO_2 nanoestruturada em forma de grãos redondos, como mostrado na Figura 10 (B, C e D). Foi observado que, quanto maior a temperatura utilizada no tratamento de O-IIIP, mais nanoporosa tornou-se a superfície das amostras.

A Figura 11 demonstra o gráfico da média aritmética dos valores do perfil de rugosidade média quadrática (nm) e área superficial (%).

Figura 11 – Análises da rugosidade média quadrática e área superficial por MFA nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



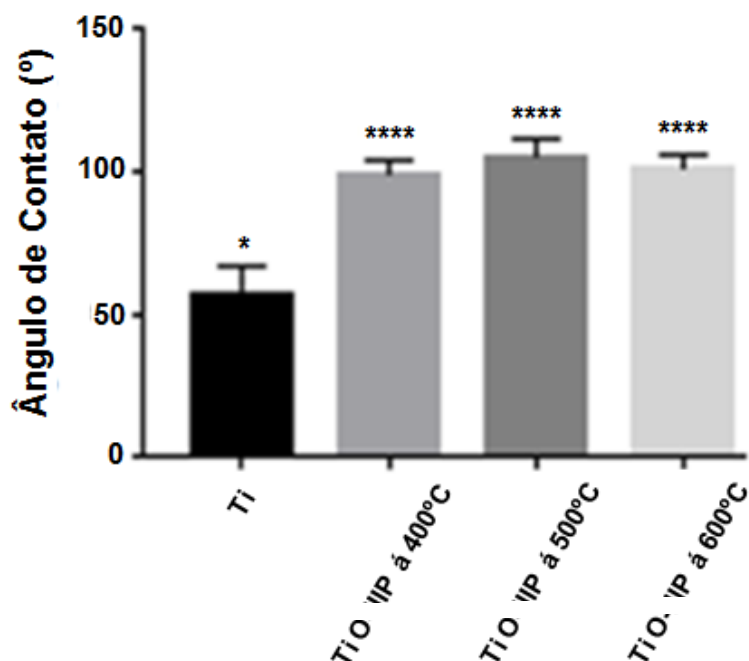
Fonte: Elaborada pelo autor.

A superfície do Ti exibiu um valor de rugosidade (R_q) de 6,57 nm, já as superfícies do Ti tratados com O-IIIP a 400°C, 500°C e 600°C exibiram os valores de rugosidade (R_q) de 6,74, 18,7 e 23,8 nm, respectivamente. Ocorreu, também, um aumento da área superficial das amostras tratadas com O-IIIP a 400°C, 500°C e 600°C (4,82%, 25% e 29,4%, respectivamente) em relação ao Ti (2,17%), conforme indica a Figura 11.

4.1.3 Molhabilidade da Superfície

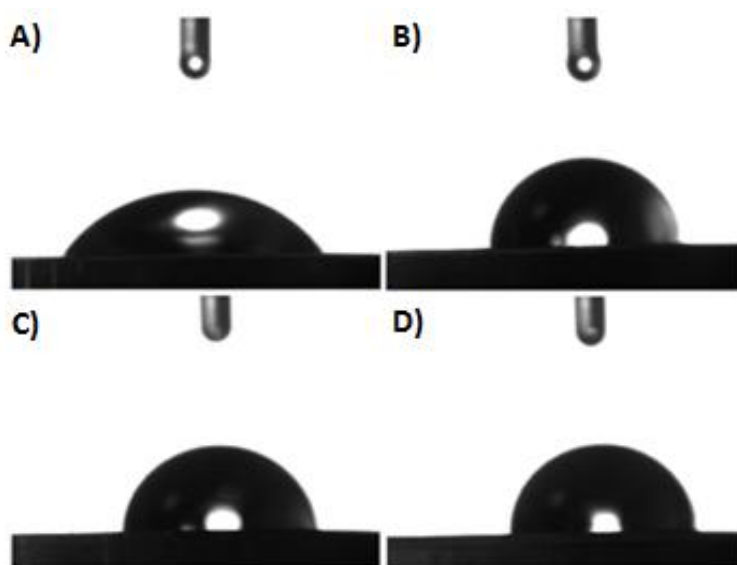
A molhabilidade das superfícies, realizada por meio da análise de ângulo de contato, foram observadas nas superfícies das amostras pré e pós tratamento com O-IIIP, conforme Figuras 12 e 13.

Figura 12 – Análises de molhabilidade da superfície nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



Legenda: Molhabilidade da superfície. **** p < 0,0001 em relação ao grupo Ti* (ANOVA e Tukey test)
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 – Ângulo de contato dos grupos



Legenda: Molhabilidade da superfície. A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

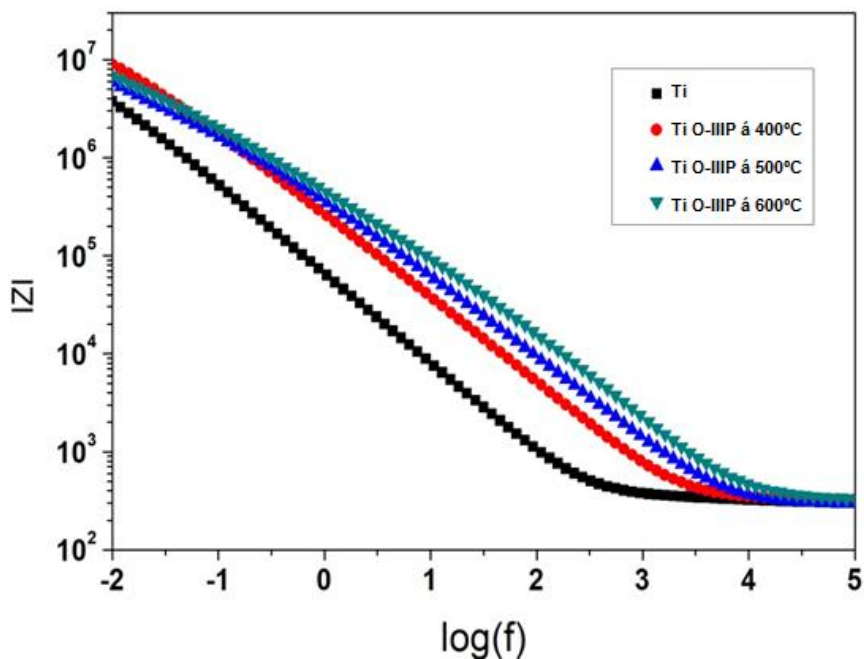
A Figura 12 demonstrou que o Ti apresentou menor valor ($57,1 \pm 10,0^\circ$) em relação a hidrofobicidade, enquanto as superfícies dos demais grupos tratados com O-IIIP (400°C , 500°C e 600°C) exibiram um aumento da hidrofobicidade, apresentando os valores de $98,9 \pm 5,4^\circ$, $105,0 \pm 6,5^\circ$ e $100,9 \pm 5,0^\circ$, respectivamente. O *one-way* ANOVA revelou uma diferença significativa ($p < 0,0001$) entre as superfícies de Ti e tratadas com O-IIIP, porém nenhuma diferença significativa entre as superfícies tratadas com O-IIIP foi observada.

A Figura 13 confirma, qualitativamente, as análises estatísticas do atual experimento. A Figura 13 (A) destaca um maior espreadimento da gota em relação a Figura 13 (B, C e D), o que permite afirmar que as amostras de Ti (pós-tratamento), independentemente da temperatura utilizada no tratamento, apresentou maior grau de hidrofobicidade na superfície quando comparadas a amostra Ti (pré-tratamento).

4.1.4 Resistência a Corrosão da Superfície

A técnica de EIE permitiu que fosse analisada a impedância dos filmes submersos em meio de sbf depois de 12 hrs de imersão, conforme Figuras 14 e 15.

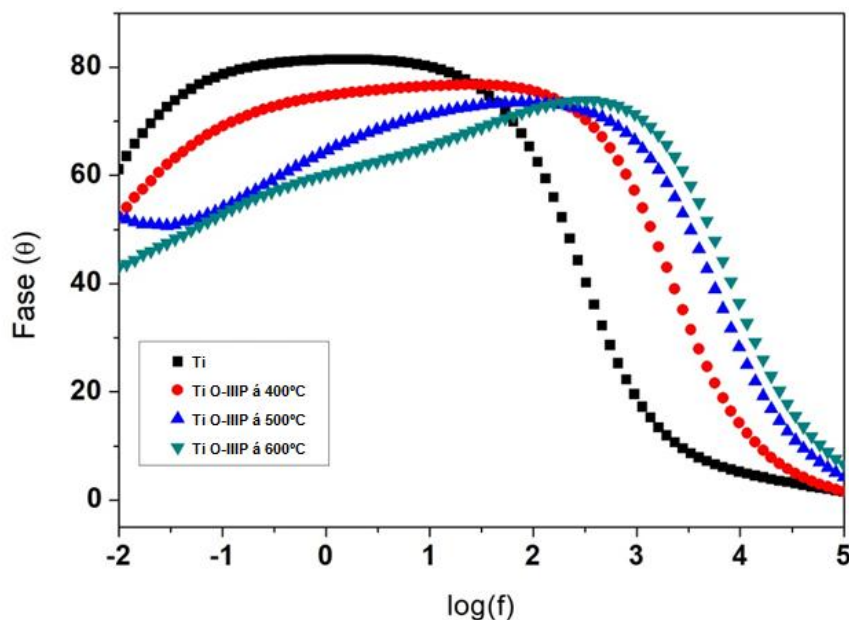
Figura 14 - Módulo da impedância após 12 horas de imersão nos grupos (Ti, Ti O-IIP a 400°C, Ti O-IIP a 500°C e Ti O-IIP a 600°C)



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 14 demonstra que a amostra Ti (pré-tratamento), em relação às demais amostras Ti (pós-tratamento), apresentou menor impedância em todas as frequências testadas, sendo a amostra Ti tratada com O-IIP a 600°C a que apresentou maior valor de impedância em frequência média. Em baixa frequência não foi possível diferenciar a impedância entre as amostras.

Figura 15 - Fase após 12 hrs de imersão nos grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)

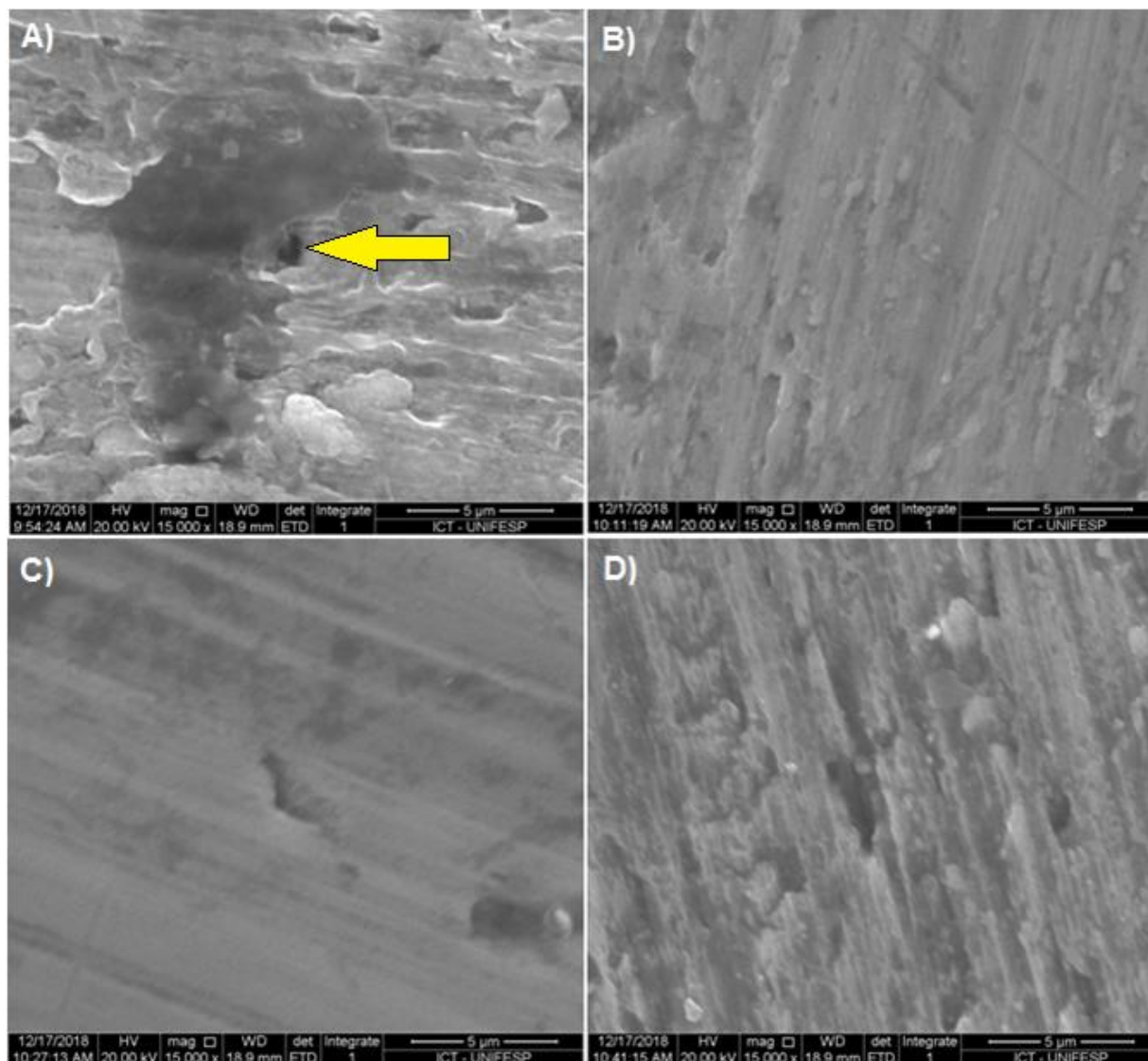


Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 15 permite afirmar que as amostras Ti tratadas com O-IIIP a 500°C e 600°C, por apresentarem maiores irregularidades em determinados picos, apresentam maior heterogeneidade nos filmes formados, entretanto a amostra Ti tratada com O-IIIP a 400°C apresenta maior similaridade com a amostra Ti (pré-tratamento) quando comparados os respectivos filmes.

A avaliação da microestrutura da superfície, considerando a baixa taxa de corrosão e inércia química das amostras, foi observada por MEV, a fim de verificar se houve modificações morfológicas da superfície das amostras em função do tempo de exposição das amostras ao SBF, como indica a Figura 16.

Figura 16 – Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura dos grupos



Legenda: A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C. (15.000x). Seta: Presença de ponto de corrosão na superfície da amostra.
Fonte: Elaborada pelo autor.

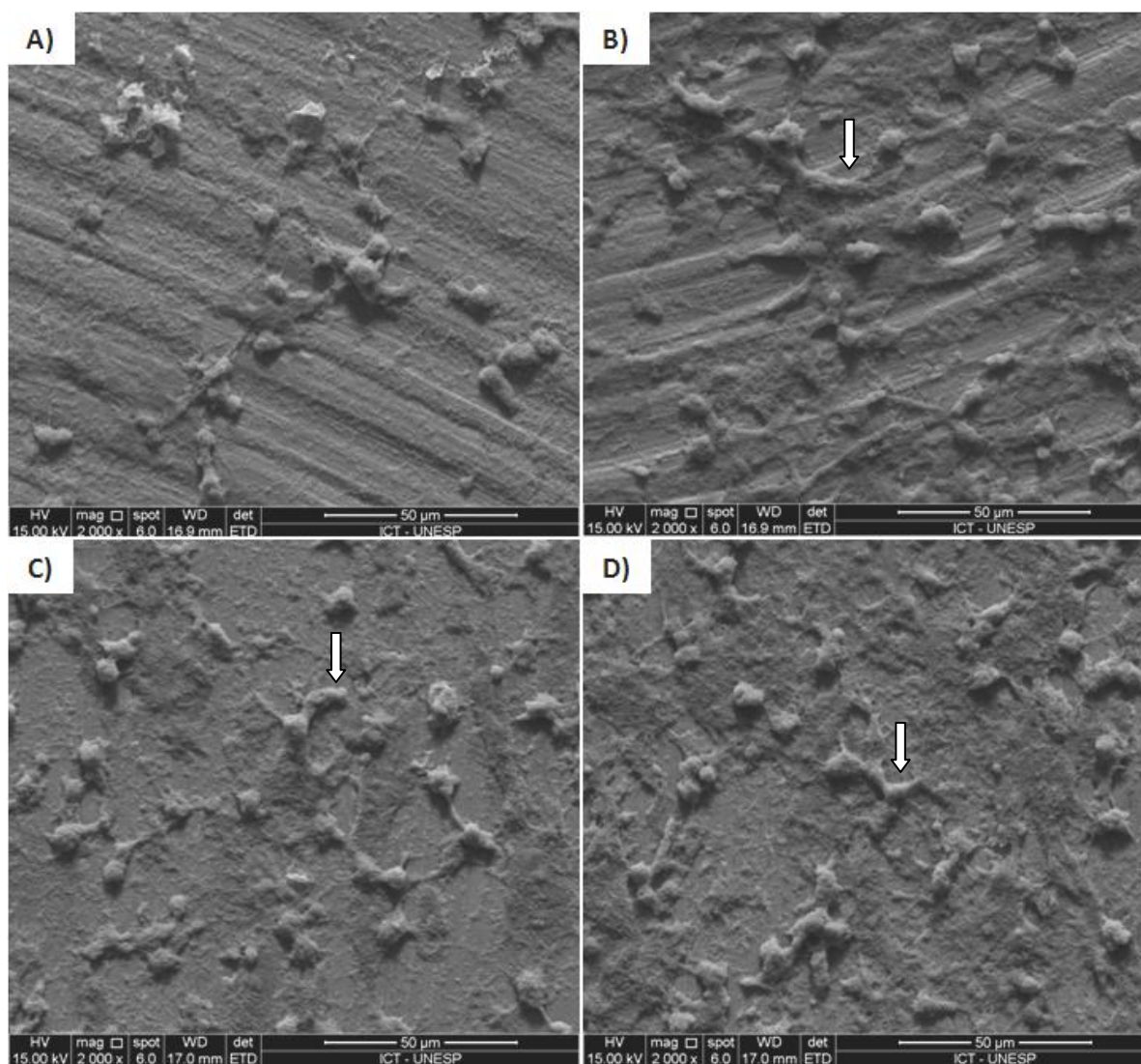
A Figura 16 (A) sugere um local de corrosão bem definido, na superfície da amostra de Ti não tratada com O-IIIP, em função da exposição com o meio de SBF. Na Figura 16 (B, C e D) não foram identificadas ocorrências de pontos bem definidos de corrosão, apresentando apenas áreas demarcadas devido ao processamento de usinagem.

4.2 Ensaios celulares *in vitro*

4.2.1 Interação Celular

Após sete dias de cultivo celular foi observada, por MEV, a interação celular sobre todas as amostras, como mostra a Figura 17.

Figura 17 – Fotomicrografia obtida por MEV da interação da linhagem MG-63 em superfície



Legenda: A) Ti. B) Ti O-IIIP a 400°C. C) Ti O-IIIP a 500°C. D) Ti O-IIIP a 600°C. (2.000x). Setas: Espraiamento celular mais evidente.

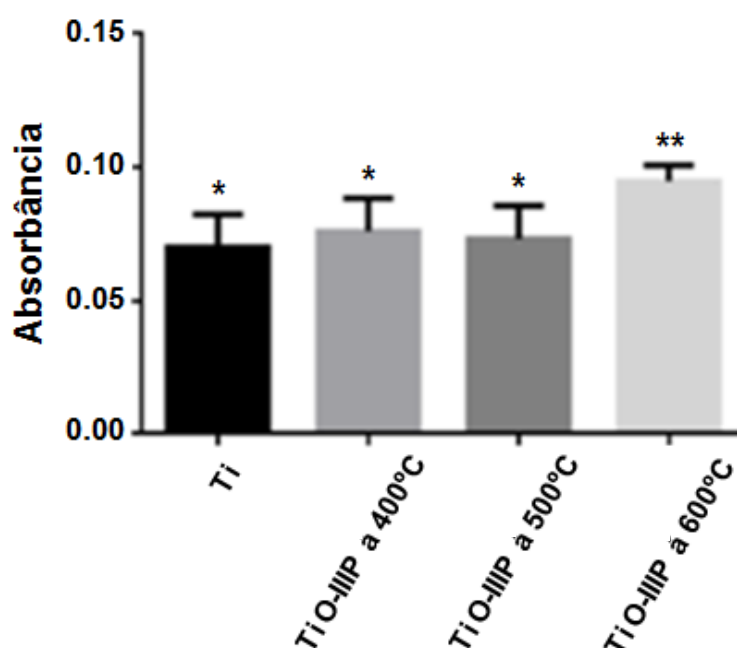
Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 17 (A) ilustra o comportamento celular sobre a amostra não submetida ao tratamento com O-IIIP, e a Figura 17 (B, C e D) ilustra o comportamento celular sobre as amostras submetidas ao tratamento O-IIIP nas temperaturas de 400°C, 500°C e 600°C, respectivamente. Foi observada que todas as amostras permitiram o espreiamento celular. Podemos sugerir que as amostras submetidas ao tratamento com O-IIIP exibiram uma adesão celular mais evidente, apresentando prolongamentos mais evidentes das células.

4.2.2 Viabilidade Celular

Após três dias de cultivo celular foi observada, por meio do corante MTT, a viabilidade celular sobre todas as amostras, como mostra a Figura 18.

Figura 18 – Análise da viabilidade celular com os grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



Legenda: Viabilidade Celular. ** p < 0,05 em relação aos grupos Ti*, Ti O-IIIP a 400°C* e Ti O-IIIP a 500°C* (ANOVA e Tukey test).

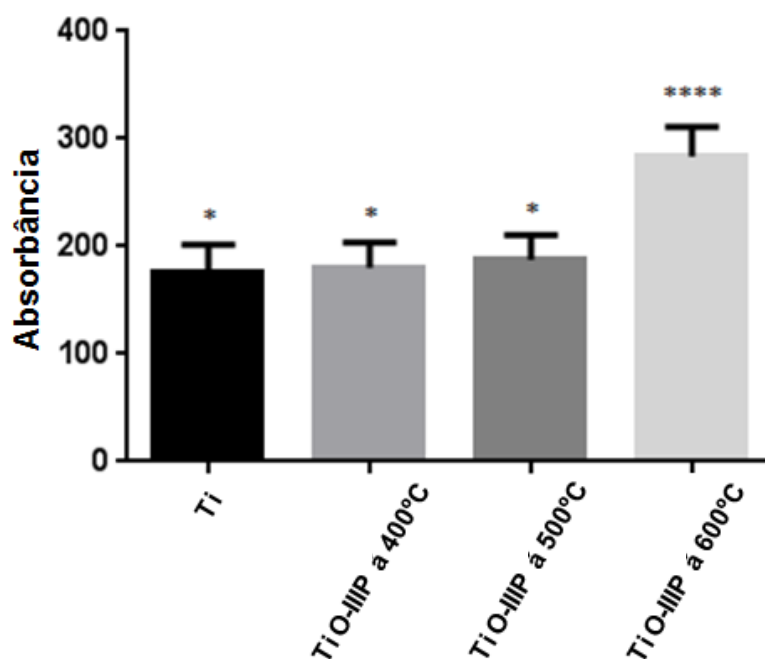
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 18 podemos observar que os grupos Ti submetidos ao tratamento com O-IIIP a 400°C e 500°C não demonstraram diferenças estatisticamente significativas com o grupo Ti (Pré-tratamento). Entretanto, o grupo submetido ao tratamento com O-IIIP a 600°C, demonstrou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da viabilidade celular das células MG-63 quando comparado aos demais grupos.

4.2.3 Conteúdo de Proteína Total

Após dez dias de cultivo celular foi observado o conteúdo de proteína total sobre todas as amostras, como mostra a Figura 19.

Figura 19 – Quantificação do conteúdo de proteína total com os grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



Legenda: Conteúdo de proteínas totais. **** $p < 0,0001$ em relação aos grupos Ti*, Ti O-IIIP a 400°C* e Ti O-IIIP a 500°C* (ANOVA e Tukey test).

Fonte: Elaborada pelo autor.

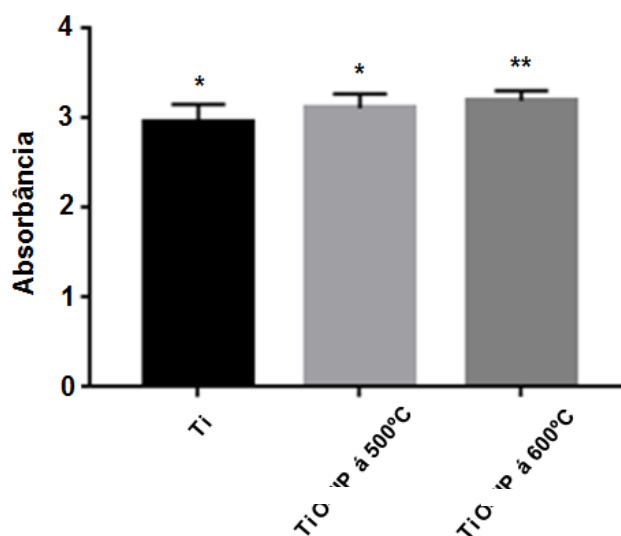
Na Figura 19 podemos observar que os grupos submetidos ao tratamento com O-IIIP a 400°C e 500°C não apresentaram alterações no nível de proteína total quando comparados com o grupo Ti (Pré-tratamento). Entretanto, o grupo Ti submetido ao tratamento com O-IIIP a 600°C apresentou aumento significativamente estatístico ($p < 0,0001$) quando comparado aos demais os grupos.

Devido aos resultados dos testes de caracterização de superfície e testes celulares *in vitro*, optou-se, a partir do experimento seguinte, em retirar o grupo tratado com O-IIIP a 400°C por, até o momento, não ter apresentado resultados significativos para continuidade do estudo.

4.2.4 Atividade de Fosfatase Alcalina

Após dez dias de incubação foi observada a atividade de fosfatase alcalina sobre todas as amostras, como mostra a Figura 20.

Figura 20 – Atividade de fosfatase alcalina com os grupos (Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



Legenda: Atividade de fosfatase alcalina. ** $p < 0,05$ em relação ao grupo Ti* e Ti O-IIIP a 500°C* (ANOVA e Tukey test).

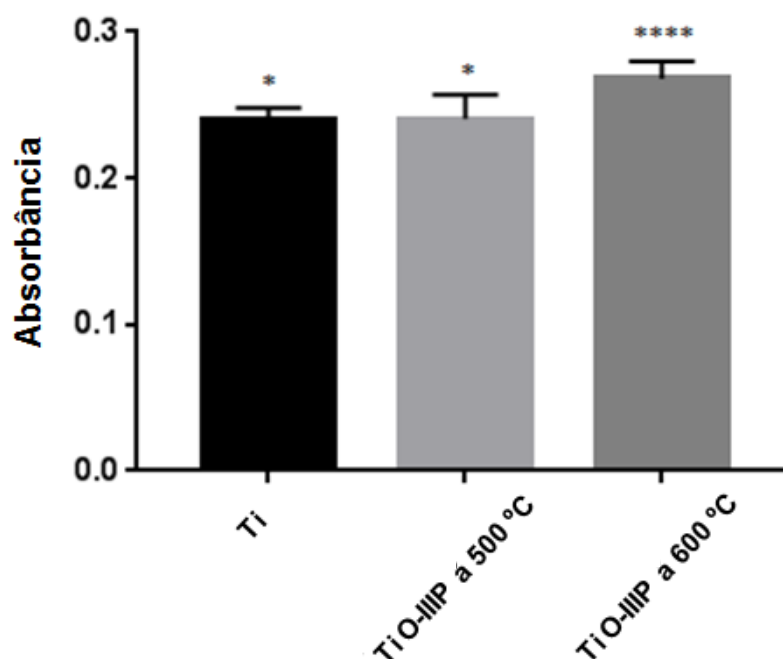
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 20 podemos observar que os grupos Ti e Ti O-IIIP a 500°C não apresentaram alterações estatisticamente significativas entre si. Entretanto, o grupo submetido ao tratamento com O-IIIP a 600°C apresentou um aumento significativamente estatístico ($p < 0,05$) da atividade de fosfatase alcalina quando comparado ao grupo Ti, não apresentando alterações significativas quando comparadas ao grupo Ti O-IIIP a 500°C.

4.2.5 Quantificação de Nódulos de Mineralização

Após quatorze dias de incubação foi observada, por meio do corante vermelho de Alizarina S (2%), a quantificação de nódulos de mineralização sobre todas as amostras, como mostra a Figura 21.

Figura 21 – Quantificação de nódulos de mineralização com os grupos (Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



Legenda: Quantificação de nódulos de mineralização. **** $p < 0,0001$ em relação aos grupos Ti* e Ti O-IIIP a 500°C* (ANOVA e Tukey test).

Fonte: Elaborada pelo autor.

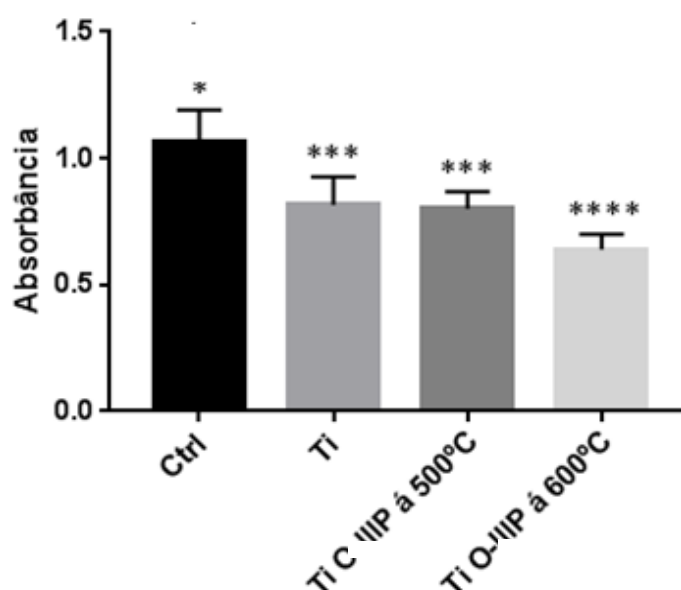
A Figura 21 demonstrou que o grupo Ti tratado com O-IIIP a 600°C apresentou aumento estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) da quantidade de nódulos de mineralização em relação aos grupos Ti e Ti O-IIIP a 500°C. No entanto, os grupos Ti e Ti O-IIIP a 500°C não apresentaram alterações quando comparados entre si.

4.3 Formação de Biofilmes Microbianos

4.3.1 Viabilidade de Biofilmes Monomicrobianos

Após vinte e quatro hrs de cultivo dos microorganismos foi analisada, por meio corante MTT, a viabilidade de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans* aderidos sobre as amostras, como demonstrado nas Figuras 22 - 25.

Figura 22 – Viabilidade de *P. aeruginosa* com os grupos (Controle, Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)

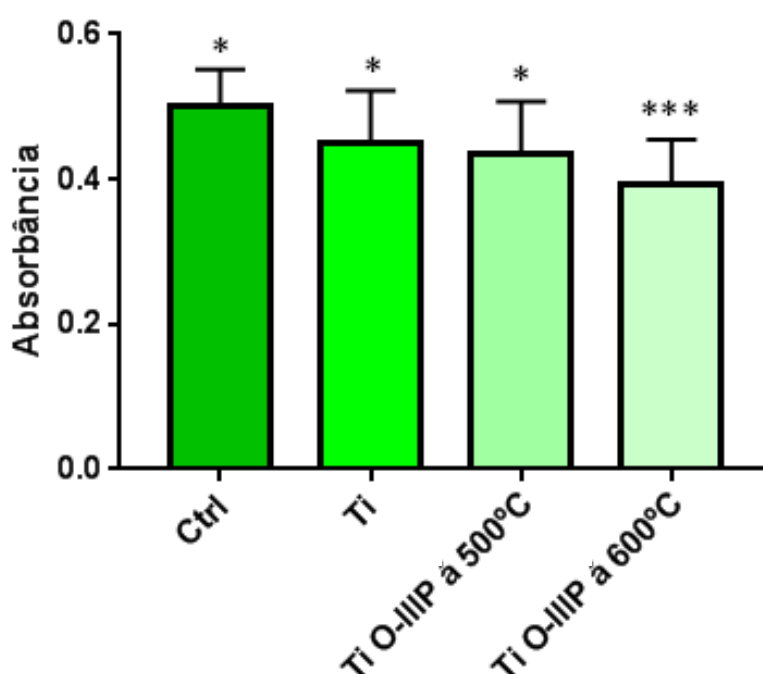


Legenda: Quantificação de *P. aeruginosa*. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo Ctrl* (ANOVA e Tukey test).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 22 podemos observar que nos grupos submetidos ao tratamento com O-IIIP a 500°C e 600°C, além do grupo Ti (pré-tratamento), a viabilidade de *P. aeruginosa* apresentou diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,00001$) em relação ao grupo controle. Contudo, o grupo submetido ao tratamento com O-IIIP a 600°C demonstrou maior da viabilidade da bactéria quando comparado aos demais grupos.

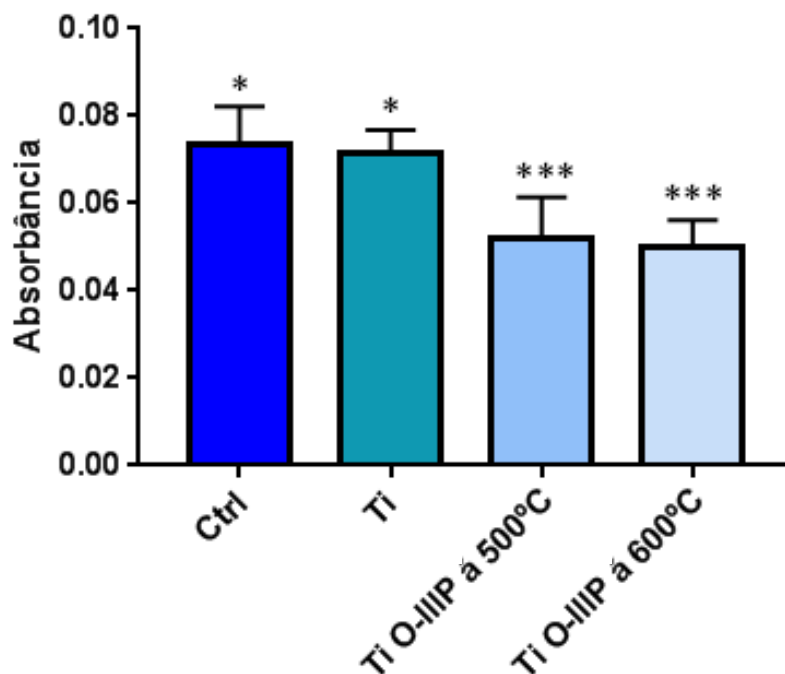
Figura 23 – Viabilidade de *S. aureus* com os grupos (Controle, Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



Legenda: Quantificação de *S. aureus*. *** $p < 0,001$ em relação aos grupos Ctrl*, Ti* e Ti O-IIIP a 500°C* (ANOVA e Tukey test).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 23 podemos observar que apenas o grupo submetido ao tratamento com O-IIIP a 600°C apresentou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) da viabilidade de *S. aureus* em relação ao grupo controle. Entretanto, os grupos submetidos ao tratamento com O-IIIP a 500°C e 600°C, além do grupo Ti (pré-tratamento), não demonstraram alterações significativas da viabilidade da bactéria quando comparados entre si.

Figura 24 – Viabilidade de *S. mutans* com os grupos (Controle, Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)

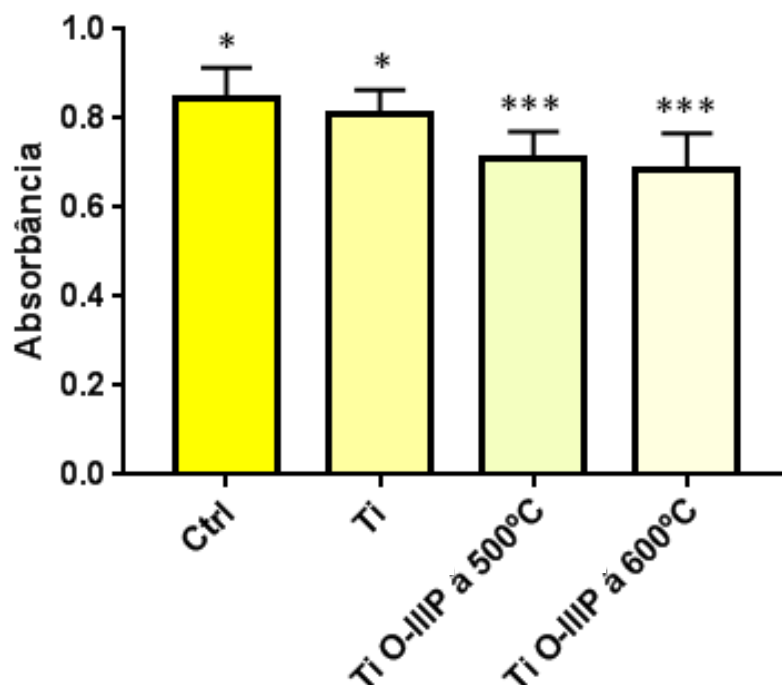


Legenda: Quantificação de *S. mutans*. ***p < 0,001 em relação aos grupos Ctrl* e Ti* (ANOVA e Tukey test).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 24 podemos observar que os grupos submetidos ao tratamento com O-IIIP a 500°C e 600°C apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) na viabilidade de *S. mutans* em relação aos grupos Ti (pré-tratamento) e controle. Entretanto, os grupos submetidos ao tratamento não apresentaram alterações quando comparados entre si.

Figura 25 – Viabilidade de *C. albicans* com os grupos (Controle, Ti, Ti O-IIIP a 500°C e Ti O-IIIP a 600°C)



Legenda: Quantificação de *C. albicans*. ***p < 0,001 em relação aos grupos Ctrl* e Ti* (ANOVA e Tukey test).

Fonte: Elaborada pelo autor.

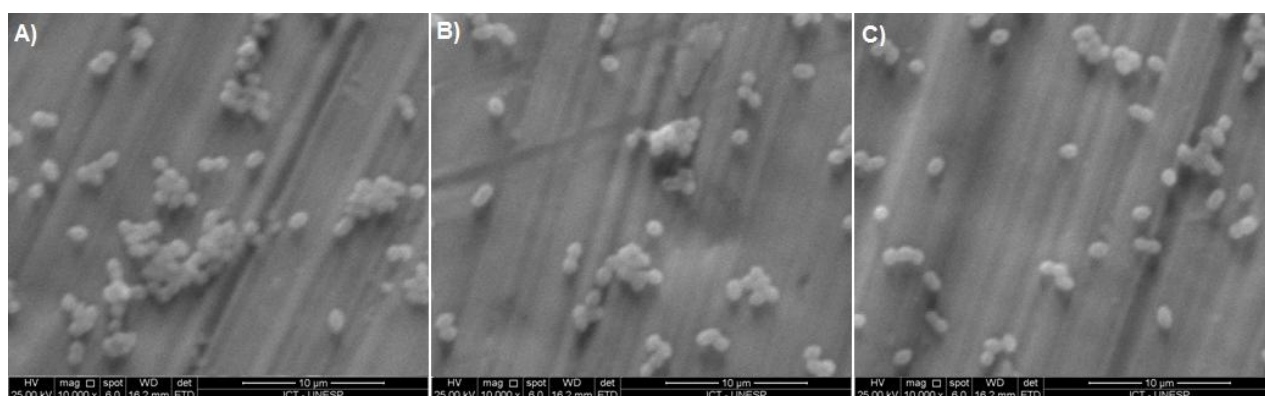
Na Figura 25 podemos observar que os grupos submetidos ao tratamento com O-IIIP a 500°C e 600°C apresentaram diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) na viabilidade de *C. albicans* em relação aos grupos Ti e controle, entretanto, esses grupos não apresentaram alterações significativas quando comparados entre si.

Devido aos resultados apresentados, optou-se, no experimento seguinte, em manter-se apenas *S. mutans*, por apresentar resultados mais viáveis para o andamento do estudo.

4.3.2 Interação de Biofilmes Monomicrobianos

Após vinte e quatro hrs de cultivo dos microorganismos foi observada, por MEV, a interação de *S. mutans* com as amostras, como mostra a Figura 26.

Figura 26 – Fotomicrografia por MEV da interação de *S. mutans* em superfície



Legenda: A) Ti. B) Ti O-IIIP a 500°C. C) Ti O-IIIP a 600°C (10.000x).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 26 (A) ilustrou a interação de *S. mutans* com a superfície das amostras de Ti não submetidas ao tratamento com O-IIIP, bem como a Figura 26 (B e C) ilustrou o comportamento de *S. mutans* sobre as amostras submetidas ao tratamento O-IIIP nas temperaturas de 500°C e 600°C, respectivamente. Em geral, todas as amostras apresentaram *S. mutans* aderidos à superfície. No entanto, as amostras submetidas ao tratamento com O-IIIP apresentaram diminuição de microorganismos quando comparadas com a amostra não submetida ao tratamento O-IIIP.

5 DISCUSSÃO

O tratamento por implantação iônica por imersão em plasma (IIIP) é responsável por modificar superfícies complexas sem promover alterações nas dimensões das amostras, além de trabalhar em uma ampla faixa de temperatura e permitir a formação de estruturas e fases sem balanceamento (Rossi, et al., 2004; Gupta, 2011). As vantagens do seu sistema de implantação é que apresentam tempos de tratamento independente do tamanho das amostras, podendo também serem usados sem manipulação especial da amostra, mesmo em casos de superfícies irregulares (Ueda *et al.*, 2007).

Recentemente Mohan *et al.* (2017) avaliaram, a partir de análises por EDS, as composições químicas e relativas superficiais de Ni, Ti e O em substratos de liga de NiTi submetidos ao tratamento com a técnica O-IIIP. Estes autores observaram um aumento no percentual de oxigênio nos substratos das ligas estudadas, sendo que os espectros mostraram a presença de níquel, titânio e oxigênio na superfície, indicando também, o enriquecimento da superfície com mais oxigênio, o qual é necessário para a formação de TiO_2 estequiométrico. Os autores concluíram que a implantação de oxigênio substitui o óxido nativo do substrato por uma camada de óxido compacta. Estes resultados corroboram com o presente estudo, o qual observou, por meio de EDS, a formação de uma maior quantidade de oxigênio nas amostras de Ti tratadas com O-IIIP a 400°C, 500°C e 600°C, demonstrando também que, quanto maior a temperatura utilizada no tratamento, maior a presença de oxigênio na superfície.

O oxigênio é encontrado na atmosfera e, devido à sua forte afinidade com o titânio, forma uma camada passiva de óxido em sua superfície, que serve como camada protetora contra a corrosão. A espessura desta camada de óxido pode sofrer algumas alterações de acordo com as condições ambientais e o tratamento (Hansen *et al.*, 2015). Em seus estudos, Hansen *et al.*, (2015) observaram que o óxido encontrado no Ti apresentava uma estrutura cristalina composta, principalmente, pela fase rutilica. Tais amostras forneceram uma melhor adesão celular na superfície, concluindo que essas características indicam que a camada de óxido obtida possui as propriedades necessárias para acelerar um processo de osseointegração, podendo ser utilizada para esse fim.

A formação de TiO_2 fase rutilo após tratamento do Ti tem sido reportado, recentemente, na literatura (Rafieian et al., 2015; Guan, Lou, 2018; Sasahara, et al., 2018). Yang *et al.* (2015) realizaram estudos com o tratamento O-IIIP para criar uma camada densa e fina de TiO_2 sobre a superfície de Ti para aplicação em implantes dentários. Os autores utilizaram o difratômetro de raios X de alta resolução para caracterizar a estrutura cristalina dos espécimes de Ti (pré e pós tratadas), o qual foi observado uma formação de camada de óxido (consistuído principalmente por TiO_2 rutilico), demonstrando a eficiência dessa técnica para identificação desse composto. No presente estudo, foi utilizada a técnica de DRX para analisar uma possível formação de TiO_2 e indicar qual a fase formada. As análises permitiram observar a presença de picos de TiO_2 na fase rutilo nos grupos tratados com O-IIIP a 500°C e 600°C , comprovando a eficácia do tratamento nessas condições e, devendo ser, possivelmente, ao maior teor de O implantado. Em contrapartida, Tóth *et al.* (2004) observaram que, após desenvolvimento de TiO_2 e óxido subestequiométrico em Ti e liga Ti6Al4V após IIIP, nenhuma fase de óxido cristalino pôde ser detectada em sua liga de Ti6Al4V após a oxidação. Os autores sugeriram que a baixa temperatura de tratamento e a presença de óxido de alumínio possam ter impedido a cristalização.

Estudos realizados por Wang *et al.* (2016) tiveram como objetivo utilizar o Ti tratado com IIIP para modificar a superfície bioinerte de polieterecetona reforçada com fibra de carbono. Após análises morfológicas da superfície das amostras por meio de análise de microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo, os autores observaram que a estrutura adquirida pelo Ti tratado com IIIP possui boa continuidade entre a camada estruturada e o substrato, minimizando as preocupações com a delaminação abrupta. Além disso, foram observadas pequenas nanopartículas de TiO_2 multinível exclusiva que cobrem totalmente a parede lateral e inferior dos nanoporos presentes, aumentando assim as propriedades osteogênicas. No estudo presente, as amostras de Ti pré e pós tratadas com O-IIIP não apresentaram nenhuma variação de textura, heterogeneidade ou microfissuras na superfície ocasionada pelo tratamento com O-IIIP, demonstrando apenas a presença de áreas demarcadas devido ao processamento de usinagem. Zepka *et al.* (2014) também constataram por MEV, melhoras nas propriedades mecânicas das superfícies tratadas com N-IIIP em diferentes temperaturas, concluindo que a

rugosidade aumentou à medida que o tempo de imersão é aumentado, com formação de nitretos na superfície de implantação.

Após análises de aspectos químicos e nanomecânicos da superfície de Ti e Ti6Al4V tratados com IIIP, Tóth *et al.* (2004) utilizaram-se da perfilometria óptica para calcular a rugosidade média (Ra) e obter micrografias ópticas antes e depois das várias etapas do tratamento. Os autores observaram que a Ra apresentou-se maior no Ti quando comparada ao TiAlV, proporcionalmente em que os grãos vão tornando-se mais visíveis, cujo tamanho é da ordem de vários μm , a qual também é notada pelo aumento do crescimento de grãos e segregação de Al em altas temperaturas. Em nosso estudo foi observado que a rugosidade média (Ra), em escala micrométrica, não apresentou alteração entre as amostras pré e pós-tratadas com O-IIIP, este fato pode estar relacionado à presença de picos e vales causados pelo processo de usinagem. Essas variações de superfície causadas pelo processo de usinagem podem ter inibido as alterações quantitativas em escala micrométrica. Por outro lado, o tratamento de superfície proporcionou um aumento da área de superfície, sendo diretamente influenciado pelo aumento de temperatura, chegando a um aumento de 36%, sendo possível visualizar o aumento da formação de grãos de acordo com o aumento da temperatura de tratamento, nas regiões de depressão da usinagem.

Observamos neste estudo, por MFA, que as amostras tratadas com O-IIIP exibiram uma estrutura superficial microscopicamente nanoporosa, apresentando uma camada de TiO_2 nanoestruturada em forma de grãos redondos, que pode ser aumentada conforme o aumento da temperatura aplicada no tratamento. Em parâmetros quantitativos, também foi observado que quanto maior a temperatura aplicada no tratamento (O-IIIP), maiores foram os valores de rugosidade média (Ra), bem como o aumento da área superficial. O aumento da rugosidade, a nível nanométrico, ocasionado pelo tratamento de O-IIIP também foi reportado Hung *et al.* (2016), que analisaram a morfologia das superfícies de Ti pré e pós-tratadas com O-IIIP por meio de MFA e, assim como em nossos resultados, o Ti exibiu superfícies relativamente planas, apenas com traços de polimento paralelos, entretanto o Ti tratado com O-IIIP apresentou uma estrutura superficial microscopicamente nanoporosa, exibindo uma camada de TiO_2 nanoestruturada mais uniforme, mais

densa e apresentando aumento de grãos redondos em comparação com o Ti (pré-tratamento).

Hung et al. (2016) também analisaram o ângulo de contato nas superfícies de Ti (pré e pós-tratamento com O-IIIP). Seus resultados demonstraram que o grupo Ti (pré-tratamento) apresentou baixo grau de hidrofobicidade em comparação com os grupos Ti (pós-tratamento com O-IIIP), enquanto estes últimos exibiram hidrofobicidade comparativa entre si quando analisados estatisticamente. Em nosso estudo, também foi observado que os grupos de Ti submetidos ao tratamento com O-IIIP não apresentaram alterações significativas quando comparadas entre si. Entretanto, observamos o aumento do grau de hidrofobicidade dos grupos submetidos ao tratamento com O-IIIP quando comparados ao grupo Ti (pré-tratamento). O aumento nos ângulos de contato das superfícies tratadas com O-IIIP pode ser atribuído às alterações nas propriedades químicas, cristalinas e morfológicas do substrato Ti. Estudos realizados por Peng e Chen (2005) indicaram que as propriedades de umidificação do filme de TiO_2 estão fortemente relacionadas com a estrutura da superfície, no qual o filme de TiO_2 rutilico nanoestruturado formado pela oxidação direta demonstrou ser altamente hidrofóbico devido ao aprisionamento de ar no interespaço nas matrizes de nanobastões.

A EIE é utilizada em estudos abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas, ou seja, processos que ocorrem em células fotovoltaicas e sistemas de corrosão (Bisquert et al., 2000; Grätzel, 2001). As medidas de avaliação da resistência à corrosão, deste estudo, evidenciaram que o aumento da temperatura de tratamento da superfície resultou em maior inércia frente à corrosão em meio de SBF, sendo que, quanto maior a temperatura utilizada no tratamento com O-IIIP, maior impedância apresentada da amostra. Tal fato permitiu confirmar o efeito protetor do tratamento a plasma em relação à corrosão nos grupos tratados com O-IIIP, destacando-se o grupo Ti O-IIIP a 600°C . Pan, Thierry e Leygraf (1994) delinearam o experimento de imersão em tampão fosfato, avaliando a resposta da espectroscopia de impedância eletroquímica da amostra em função do tempo. Os autores observaram uma pigmentação escura no titânio exposto por várias semanas ao PBS com adições de H_2O_2 , possivelmente podendo ser um ponto de corrosão ocasionado pelo tratamento.

Recentemente, estudos envolvendo análises celulares em superfícies de titânio tem sido reportados na literatura (Gehrke et al., 2018; Ureña et al., 2018; Kasnak et al., 2019) por providenciarem uma ferramenta de sucesso para pesquisas, uma vez que as interações celulares com a superfície de biomateriais podem ser avaliadas de forma mais detalhada. A biocompatibilidade do material e a atividade das células estão intimamente relacionadas entre si, sendo que, a proliferação e adesão celular correspondem à primeira fase dessa interação, na qual a qualidade nessas etapas influenciará ao desenvolvimento e na diferenciação celular na superfície do material (Sista et al., 2011). No presente estudo foi possível observar, por MEV, que houve interação positiva de MG-63 com as amostras submetidas ao tratamento com O-IIIP, uma vez que, apresentaram adesão celular mais evidente, com prolongamentos celulares mais evidenciados. Soares et al. (2018) também observaram que esta linhagem celular apresentaram formatos mais prolongados, envoltos em citoplasma abundante, bem definido e intacto quando em contato com Ti.

Kiran et al. (2018) avaliaram a viabilidade de MG-63 em superfícies de Ti em diferentes períodos. Todas as amostras exibiram crescimento celular ao longo de um período de tempo, com aumento significativo de viabilidade celular. As amostras submetidas aos tratamentos com maior grau de mudanças morfológicas nas superfícies apresentaram aumento ainda maior de viabilidade celular, evidenciando que, o crescimento celular pode ser afetado pelo tratamento de superfícies. Nossos resultados também corroboram com o estudo citado acima por ter sido observado que nenhum grupo (pós-tratamento) demonstrou ser citotóxico em relação ao grupo controle. Adicionalmente, constatamos um aumento significativo na viabilidade de células do grupo Ti submetido ao tratamento com O-IIIP a 600°C, quando comparados aos demais grupos.

O conteúdo de proteína total é um importante parâmetro de avaliação da osteogênese. No presente estudo, foi observado que o grupo Ti submetido a maior temperatura (600°C) de tratamento com O-IIIP apresentou maior quantidade de proteína total quando comparado aos demais grupos (Ti, Ti O-IIIP a 400°C e Ti O-IIIP a 500°C). Cheg et al. (2018) observaram que superfícies tratadas com oxidação hidrotérmica de micro-ondas de baixa temperatura promoveram influência positiva no DNA de células MG-63, porém não alterou os valores de fosfatase alcalina e

osteoprotegerina, porém afetou negativamente a expressão de osteocalcina. No presente estudo, apenas o Ti submetido ao tratamento com O-IIIP a 600°C promoveu aumento dos níveis de fosfatase alcalina. Esta enzima é responsável pela iniciação do processo de calcificação osteóide, servindo também como um marcador celular precoce de osteoblastos (Hernández-Gil, et al., 2006; Huang, et al., 2007; Baranowski et al., 2016).

Estudo realizado por Baranowski et al. (2016) sobre a funcionalização da superfície de implantes ortopédicos de titânio com sialoproteína óssea (BSP) em cultura osteoblástica permitiram considerar que, após o período de cultivo, o teste realizado com o corante Vermelho de Alizarina S revelou aumento na deposição de cálcio nas populações de osteoblastos cultivadas com BSP com aditivo de proteína óssea morfogenética 7 (BMP-7) em comparação com o grupo controle sem aditivos (meio de proliferação). Nossos resultados, os quais também foram realizados utilizando o mesmo corante (Vermelho de Alizarina S), demonstraram que o grupo Ti tratado com O-IIIP a 600°C apresentou aumento significativo de quantidade de nódulos de matriz mineralizada em relação aos grupos Ti (pré-tratamento) e Ti O-IIIP a 500°C, o qual também corrobora com o aumento da atividade de fosfatase alcalina, como descrito anteriormente. No entanto, os grupos Ti e Ti O-IIIP a 500°C não apresentaram alterações significativas de quantidade de nódulos de mineralização quando comparados entre si.

Ren et al. (2014), em seus estudos, afirmam que ensaios com cultura celular, *in vitro*, mostram claramente que a superfície micro/nanotexturizada de TiAlNb induz melhor fixação, disseminação, proliferação e maior atividade de fosfatase alcalina de células, que superfícies polidas. No presente estudo, observou-se que as alterações superfícies das amostras de Ti tratadas com O-IIIP a 600°C resultaram em melhoras nas propriedades celulares (MG-63) em relação a adesão, viabilidade, expressão protéica, atividade de fosfatase alcalina e mineralização da matriz.

A eliminação de microorganismos e suas toxinas de superfícies de implantes é um pré requisito fundamental para deter a progressão de peri-implantite, além de possibilitar um tratamento bem sucedido dos implantes (Froum, Rosen, 2012; Atieh et al., 2013; Valderrama et al., 2014). Tem sido demonstrado que a bactéria Gram-positiva *S. aureus* possui grande afinidade aos substratos de Ti, particularmente aqueles com um acabamento de superfície rugosa (Aguayo et al., 2015; Izquierdo-

Barba et al., 2015). Giannelli et al. (2016) observaram os efeitos do laser de diodo sobre o biofilme de *S. aureus* aderente à superfície de óxido de titânio de implantes dentários. Após suas análises, foi observado que esse tratamento (modos pulsado e contínuo) induziu uma redução significativa de células viáveis em comparação com o biofilme não tratado. A irradiação em modo contínuo pareceu ter maior eficácia em termos de redução de viabilidade, embora na comparação entre os dois tratamentos não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa. No estudo presente, foi observado que apenas o grupo Ti submetido ao tratamento com O-IIIP a 600°C apresentou diminuição significativa na viabilidade celular de *S. aureus* em relação ao grupo controle, sendo que os demais grupos não demonstraram alterações significativas entre si. Entretanto, os grupos Ti e Ti O-IIIP a 500°C apresentam uma tendência a diminuição da viabilidade celular, apesar de não ser observada diferença estatística.

Fatani et al. (2017) avaliaram, *in vitro*, braquetes ortodônticos de aço inoxidável, revestidos com óxido de titânio misturado à Ag, como propriedades antiaderentes e antibacterianas em *S. mutans* e *P. gingivalis*. Os autores observaram que ocorreu formação de biofilme em todos os braquetes avaliados, sendo menor em braquetes revestidos com Ag + TiO₂, que no grupo controle. Observaram ainda um decréscimo significativo no crescimento bacteriano em braquetes revestidos com Ag, TiO₂ e Ag + TiO₂. Nossos resultados demonstraram que o tratamento do Ti com O-IIIP (500°C e 600°C) demonstrou diminuição significativa da viabilidade de *S. mutans* em relação aos grupos Ti (pré-tratamento) e controle. Entretanto, esses grupos não apresentaram diferenças significativas entre si.

No presente estudo observamos que, após um dia de cultivo, os grupos Ti, Ti O-IIIP a 500°C e 600°C demonstraram diminuição significativa de viabilidade de *P. aeruginosa* em relação ao grupo controle, sendo que o grupo Ti O-IIIP a 600°C apresentou maior diminuição, quando comparado aos demais grupos. Entretanto, os grupos Ti e Ti O-IIIP a 500°C não demonstraram alterações significativas na viabilidade de *P. aeruginosa* quando comparados entre si. Estudos realizados por Filho et al. (2018) afirmaram que a composição química da superfície de titânio interfere na formação de biofilme de *P. aeruginosa*. Após quantificarem a adesão de bactérias em amostras de Ti, e TiN, os autores observaram que TiN apresentou

maior desempenho contra a adesão bacteriana e formação de agregados, constando também que em Ti (pré-tratamento), após as primeiras três horas de cultura, menos de 20% das bactérias estavam aderidas individualmente e, após seis horas, essa proporção aumentou. No TiN após três horas de incubação, cerca de 80% das bactérias estavam aderidas e, após seis horas de exposição a superfícies de nitreto, as bactérias não foram capazes de se fixar, o que sinaliza estabilidade. Tais resultados apontaram para uma correlação entre o estado químico do Ti e a interferência observada nos primeiros passos de formação do biofilme de *P. aeruginosa*. Jeyachandran et al. (2007) sugeriram que o estado químico e a rugosidade são as principais influências na interação das bactérias com a superfície do implante.

Estudos prévios demonstraram que biofilmes de *Candida spp.* têm exibido resistência aos antifúngicos e, embora várias hipóteses tenham sido propostas, nenhuma delas parece explicar claramente o fenômeno do aumento da resistência. No caso de materiais para implantes catéteres, a rugosidade da superfície tem demonstrado influenciar a adesão destes microrganismos a eles (Douglas, 2002; Ramasamy, Lee, 2016; Vargas-Blanco et al., 2017). Em pesquisa realizada por Tsang et al., (2007) sobre biofilmes de *C. albicans* em discos de titânio com diferentes rugosidades, notou-se que, a partir do jateamento com 99,6% de óxido de alumínio de diferentes tamanhos (25 µm, 110 µm e 250 µm) de grãos, não houve nenhuma diferença significativa na adesão da levedura entre os grupos. Em contrapartida, observamos que os grupos de Ti submetidos ao tratamento com O-IIIP a 500°C e 600°C apresentaram diminuição significativa da viabilidade de *C. albicans* em relação aos grupos Ti (pré-tratamento) e controle, entretanto, esses grupos não apresentaram alterações significativamente estatísticas quando comparados entre si.

Estudo realizado por Xavier et al. (2017) demonstraram, por MEV, que colônias de *S. mutans* apresentaram-se separadas ou como aglomerados na superfície de titânio, na qual uma quantidade significativa de acúmulo de biofilme foi notada em amostras imersas em meios onde nenhum lactam U27 foi adicionado, contrastando com superfícies de titânio incubadas na presença do inibidor de biofilme, as quais demonstravam estar livres de colônias de *S. mutans*. Os autores também observaram irregularidades de superfície, como depressões profundas,

provavelmente originadas do processo de fabricação, sendo suscetíveis ao acúmulo de *S. mutans*, na qual a presença de mucina aderida à superfície do titânio, associada às colônias de *S. mutans*, possivelmente forneceu a película inicial para posterior adesão de biofilme. No atual estudo, foi observado que, em geral, todas as amostras apresentaram microorganismos *S. mutans* aderidos na superfície, podendo ser considerado que as amostras de Ti submetidas ao tratamento com O-IIIIP apresentaram evidente diminuição de microorganismos quando comparadas com a amostra Ti (pré-tratamento).

6 CONCLUSÃO

As análises de caracterização de superfície das amostras permitiram concluir que, o tratamento com O-IIIP em diferentes temperaturas (400°C e 500°C e 600°C) promoveu, em relação ao Ti (grau IV), aumento da rugosidade na superfície, maior hidrofobicidade, resistência à corrosão, aumento da presença de oxigênio e formação do TiO₂-rutilo, conforme aumento da temperatura utilizada no tratamento.

As alterações das propriedades das superfícies resultaram em melhoras na atividade de MG-63 quando utilizado o tratamento com O-IIIP a 600°C.

O tratamento com O-IIIP promoveu redução da viabilidade celular de biofilmes monomicrobianos de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*, independentemente da temperatura utilizada.

A partir dos resultados obtidos, pode ser sugerida a utilização do tratamento com O-IIIP a 600°C em amostras de Ti grau IV, devido à melhor correlação de biocompatibilidade, inclusão de osteogênese e atividade antimicrobiana apresentadas.

REFERÊNCIAS*

- Aguayo S, Donos N, Spratt D, Bozec L. Nanoadhesion of *staphylococcus aureus* onto titanium implant surfaces. *J Dent Res*. 2015;(94):1078–84.
- Anders A, Pelletier J. Plasma-based ion implantation and deposition: A review of physics, technology, and applications. *IEEE Trans Plasma Sci* (Special Issue on Ion Sources). 2006;33(6):1944–59.
- Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta- analysis. *J Periodontol*. 2013;84(11):1586-98.
- Baranowski A, Klein A, Ritz U, Ackermann A, Anthonissen J, Kaufmann KB, et al. Surface functionalization of orthopedic titanium implants with bone sialoprotein. *PLoS One*. 2016;11(4). doi:10.1371/journal.pone.0153978.
- Bisquert J, Garcia-Belmonte G, Fabregat-Santiago F, Ferriols NS, Bogdanoff P, Pereira EC. Doubling Exponent Models for the Analysis of Porous Film Electrodes by Impedance. *Relaxation of TiO₂ Nanoporous in Aqueous Solution*. *J Phys Chem B*. 2000;104(10):2287–98.
- Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry. Quintessence Publishing. 1985;(31):99–116.
- Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: Lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virul*. 2015;(6):183–7.
- Cheng A, Goodwin WB, de Glee BM, Gittens RA, Vernon JP, Hyzy SL, et al. Surface modification of bulk titanium substrates for biomedical applications via low-temperature microwave hydrothermal oxidation. *J Biomed Mater Res*. 2018;(106):782-96.
- Cortelli SC, Cortelli JR, Romero LR, Costa FO, Aquino DR, Orzechowski PP, et al. Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Arch Oral Biol*. 2013;58(1):67-74.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Do Prado RF, de Vasconcellos LGO, de Vasconcellos LMR, Cairo CAA, Leite DO, dos Santos A, et al. *In vivo* osteogenesis and *in vitro* *Streptococcus mutans* adherence: porous-surfaced cylindrical implants vs rough-surfaced threaded implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(6):1630–8.

Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*. 2002;(19):139–43.

El-wassefy NA, Hammouda IM, Habib AN, El-awady GY, Marzook HA. Assessment of anodized titanium implants bioactivity. *Clin Oral Implants*. 2014;25(2):1-9. doi: 10.1111/clr.12031.

Fatani EJ, Almutairi HA, Alharbi AO, Alnakhli YO, Divakar DD, Muzahed, et al. *In vitro* assessment of stainless steel orthodontic brackets coated with titanium oxide mixed Ag for anti-adherent and antibacterial properties against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*. 2017;(112):190-4.

Froum SJ, Rosen PS. A proposed classification for peri-implantitis. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2012;32(5):533–40.

Gehrke SA, Dedavid BA, Júnior JSA, Pérez-Díaz L, Guirado JLC, Canales PM, et al. Effect of Different Morphology of Titanium Surface on the Bone Healing in Defects Filled Only with Blood Clot: A New Animal Study Design. *BioMed Res Int*. 2018; Article ID 4265474. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/4265474>.

Giannelli M, Pini A, Formigli L, Bani D. Comparative *in vitro* study among the effects of different laser and LED irradiation protocols and conventional chlorhexidine treatment for deactivation of bacterial lipopolysaccharide adherent to titanium surface. *Photomed Laser Surg*. 2011;(29):573–80.

Giannelli M, Landini G, Materassi F, Chellini F, Antonelli A, Tani, et al. The effects of diode laser on *Staphylococcus aureus* biofilm and *Escherichia coli* lipopolysaccharide adherent to titanium oxide surface of dental implants. An *in vitro* study. *Lasers in Med Sci*. 2016;31(8):1613–9.

Goene RJ, Testori T, Trishi P. Influence of a nanometer-scale surface enhancement on the novo bone formation on titanium implants: a histomorphometric study in human maxillae. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007;27(3):211-9.

Grätzel M. Photoelectrochemical cells. *Nat*. 2001;414:338–44.

Guan B Y, Lou XW. Asymmetric Mesoporous Rutile TiO₂ Microspheres with Single-Crystal-like Frameworks. SciDirect. J&B. 2018;(4):2264-6.

Guglielmotti MB, Domingo MG, Steimetz T, Ramos E, Paparella EL, Olmedo DG. Migration of titanium dioxide microparticles and nanoparticles through the body and deposition in the gingiva: an experimental study in rats. Eur J Oral Sci. 2015;(23):242–8.

Gupta D. Plasma Immersion Ion Implantation (PIII) Process - Physics AND Technology. Int J Adv Comput Technol. 2011; 2(4):471-90

Hansen AW, Beltrami LVR, Antonini LM, Villarinho DJ, das Neves JCK Marino CEB. Oxide Formation on NiTi Surface: Influence of the Heat Treatment Time to Achieve the Shape Memory. Mater Res. 2015;18(5).
<http://dx.doi.org/10.1590/1516-1439.022415>.

Heringa MB, Peters RJB, Bleys RLAW, Van der Lee MK, Tromp PC, Van Kesteren PCE, et al. Detection of titanium particles in human liver and spleen and possible health implications. Part Fibre Toxicol. 2018;15(1):15

Hernández-Gil IFT, Gracia MAA, Pingarrón MC, Jerez LB. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11:E47-51.

Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. Front Biosci. 2007;12:3068–92.

Hung WC, Chang FM, Yang TS, Ou KL, Lin CT, Peng PW. Oxygen-implanted induced formation of oxide layer enhances blood compatibility on titanium for biomedical applications. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016;68:523-9.

Izquierdo-Barba I, García-Martín JM, Álvarez R, Palmero A, Esteban J, Pérez-Jorge C, ET al. Nanocolumnar coatings with selective behavior towards osteoblast and *Staphylococcus aureus* proliferation. Acta Biomater. 2015;15:20–8.

Jeyachandran YL, Venkatachalam S, Karunagaran B, Narayandass SK, Mangalaraj D, Bao CY, et al. Bacterial adhesion studies on titanium, titanium nitride and modified hydroxyapatite thin films. Mater Sci Eng C . 2007;27:35–41.

Kasnak G, Fteita D, Jaatinen O, Könönen E, Tunali M, Gürsoy M, ET al. Regulatory effects of PRF and titanium surfaces on cellular adhesion, spread, and cytokine expressions of gingival keratinocytes. *Histochem Cell Biol.* 2019;152(1):63-73. doi: 10.1007/s00418-019-01774-8..

Kiran ASK, Kumar TSS, Perumal G, Sanghavi R, Doble M, Ramakrishna S. Dual nanofibrous bioactive coating and antimicrobial surface treatment for infection resistant titanium implants. *Prog Org Coat.* 2018;121:112-9.

Kohavi D, Badihi L, Rosen G, Steinberg D, Sela MN. An *in vivo* method for measuring the adsorption of plasma proteins to titanium in humans. *Biofouling.* 2013;29(10):1215-24.

Kostov KG, Ueda M, Lepiensky M, Soares JR, Gomes GF, Silva MM, et al. Surface modification of metal alloys by plasma immersion ion implantation and subsequent plasma nitriding. *Surf Coat Technol.* 2004;186(1-2):204-8.

Lavenus S, Trichet V, Le Chevalier S, Hoornaert A, Louarn G, Layrolle P. Cell differentiation and osseointegration influenced by nanoscale anodized titanium surfaces. *Nanomed (Lond).* 2012;7(7):967-80. doi: 10.2217/nnm.11.181.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem.* 1951;193(1):265-75..

Maik S, Lind M, Mygind T, Baatrup A, Dolatshahi-Pirouz A, Li H. Morphology, proliferation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on titanium, tantalum, and chromium surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;86(1):448-58.

Mandl S, Krause D, Thorwarth G, Sader R, Zeilhofer F, Horch HH, et al. Biocompatibility of titanium based implants treated with plasma immersion ion implantation. *Surf Coat Technol.* 2001;(142):1046-1050.

Mandl S, Sader R, Thorwarth G, Krause D, Zeilhofer HF, Horch HH, et al. Investigation on plasma immersion ion implantation treated medical implants. *Biomol Eng.* 2002;(19):129–32.

Mandl S, Sader R, Thorwarth G, Krause D, Zeilhofer HF, Horch HH, et al. Biocompatibility of titanium based implants treated with plasma immersion ion implantation. *Nucl Instrum Methods Phys Res B.* 2003;(206):517–21.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virul.* 2013;(4):119–28.

Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomater.* 2007;28(32):4748-55.

Michalska M, Gambacorta F, Divan R, Aranson IS, Sokolov A, Noirot P, et al. Tuning antimicrobial properties of biomimetic nanopatterned surfaces. *Nanoscale.* 2018;(10):6639-50.

Mohan L, Chakraborty M, Viswanathan S, Mandal C, Bera P, Aruna ST, et al. Corrosion, wear, and cell culture studies of oxygen ion implanted Ni–Ti alloy. *Surf Interface Anal.* 2017;(49):828–36.

Morais MN, Silveira WC, Teixeira LEM, Araújo ID. Mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials. DOI: 10.5935/2238-3182.20130015. *Rev Med Minas Gerais.* 2013;23(1):96-101.

Munoz-castro AE, Lopez-callejas R, Granda-gutierrez EE, Valencia-alvarado R, Barocio SR, Pena-eguiluz R, et al. Ion implantation of oxygen and nitrogen in cpti. *Prog Org Coat.* 2009;(64):259–63.

Orsini G, Piatelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A. Randomized controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol.* 2007;78(2):209-18.

Pan J, Thierry D, Leygraf C. Electrochemical and XPS studies of titanium for biomaterial applications with respect to the effect of hydrogen peroxide. *J Biomed Mater Res.* 1994;28(1):113-22.

Peng X, Chen A. *Applied Physics A: Mater Sci Process* 80. 2005;(339):473–6.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit. Rev. Microbiol.* 2010;(36):1–53.

Qianli H, Tarek AE, Xujie L, Ranran Z, Xing Y, Zhijian S. SaOS-2 cell response to macro-porous boron-incorporated TiO₂ coating prepared by microarc oxidation on titanium. *Mat Sci and Eng.* 2016;(67):195–204.

Rafieian D, Ogieglo O, Savenije T, Lammertink RGH. Controlled formation of anatase and rutile TiO₂ thin films by reactive magnetron sputtering. AIP Adv. 2015;(5) 097168. <https://doi.org/10.1063/1.4931925>.

Ramasamy M, Lee J. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. Biomed Res Int. 2016; Article ID 1851242, 17 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1851242>.

Ren N, Zhang S, Li Y, Shen S, Niu Q, Zhao Y, Kong L. Bone mesenchymal stem cell functions on the hierarchical micro/nanotopographies of the Ti-6Al-7Nb alloy. Br J Oral Maxillofac Surg. 2014;52(10):907-12.

Rossi JO, Ueda M, Barroso JJ. Pulsed power modulators for surface treatment by plasma immersion ion implantation. Braz. J. Phys. 2004;(34):n.4b, pp.1565-1571. ISSN 0103-9733. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-97332004000800011>.

Sasahara A, Murakami T, Tomitori M. Dependence of calcium phosphate formation on nanostructure of rutile TiO₂(110) surfaces. Jpn J Appl Phys. 2018;(57):11.

Shrestha B, Theerathavaj ML, Thaweboon S, Thaweboon B. *In vitro* antimicrobial effects of grape seed extract on peri-implantitis microflora in craniofacial implants. Asian Pac J Trop Biomed. 2012;(2):822–5.

Sidambe AT. Biocompatibility of Advanced Manufactured Titanium Implants - A Rev. Mater. 2014;(7):8168-88.

Sista S, Wen C, Hodgson PD, Pande G. The influence of surface energy of titanium-zirconium alloy on osteoblast cell functions *in vitro*. J Biomed Mater Res A. 2011;(97):27-36.

Soares TP, Garcia CSC, Roesch-Ely M, da Costa MEHM, Aguzzoli C, Giovanela M. Cytotoxicity and antibacterial efficacy of silver deposited onto titanium plates by low-energy ion implantation. J Mater Res. 2018;(33):n17.

Thurnheer T, Belibasakis GN. Incorporation of staphylococci into titanium-grown biofilms: an *in vitro* "submucosal" biofilm model for peri-implantitis. Clin Oral Implants Res. 2015; 27(7):890-5. doi: 10.1111/clr.12715.

Tian XB, Zeng ZM, Zhang, T, Tang BY, Chu P.K. Medium temperature plasma immersion-ion implantation of austenitic stainless steel. *Thin Solid Films*. 2000;(366):150-4.

Tóth A, Mohai M, Ujvári T, Bell T, Dong H, Bertóti I. Surface chemical and nanomechanical aspects of air PIII-treated Ti and Ti-alloy. *Surf Coat Technol*. 2004;186(1–2):248-54.

Tseng CSP, Ng H, McMillan AS. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clin Oral Invest*. 2007;(11):361–8.

Ueda M, Silva MM, Lepienski CM, Soares PC, Gonçalves JN, Reuther H. High temperature plasma immersion ion implantation of Ti6Al4V. *Surf Coat Technol*. 2007;(201):4953-6.

Ureña J, Tsipas S, Jiménez-Morales A, Gordo E, Detsch R, Boccaccini AR. Cellular behaviour of bone marrow stromal cells on modified Ti-Nb surfaces. *Mater Des*. 2018;(140):452-9.

Valderrama P, Blansett JA, Gonzalez MG, Cantu MG, Wilson TG. Detoxification of Implant Surfaces Affected by Peri-Implant Disease: An Overview of Non-surgical Methods. *Open Dent J*. 2014;(8):77-84.

Valencia-alvarado R, Lopez-callejas R, Barocio SR, Mercado-cabrera A, Pena-eguiluz R, Munoz-castro AE, et al. TiO₂ films in the rutile and anatase phases produced by inductively coupled rf plasmas. *Surf Coat Technol*. 2010;(204):3078–81.

Vargas-Blanco D, Lynn A, Rosch J, Noreldin R, Salerni A, Lambert C, et al. A pre-therapeutic coating for medical devices that prevents the attachment of *Candida albicans*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;(16):41.

Wang H, Kwok DT, Wang W, Wu Z, Tong L, Zhang Y, et al. *Biomaterials*, 31 (2010), pp. 413-419. Osteoblast behavior on polytetrafluoroethylene modified by long pulse, high frequency oxygen plasma immersion ion implantation. *Biomater*. 2010;(31):413–9.

Wang X, Lu T, Wen J, Xu L, Zeng D, Wu Q, et al. Selective responses of human gingival fibroblasts and bacteria on carbon fiber reinforced polyetheretherketone with multilevel nanostructured TiO₂. *Biomater*. 2016;(83):207-18.

Whitehead KA, Colligon J, Verran J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloid Surf B*. 2005;41(2-3):129–38.

Xavier JG, Geremias TC, Montero JFD, Vahey BR, Benfatti CAM, Souza JCM, et al. Lactam inhibiting *Streptococcus mutans* growth on titanium. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;(68):837-41.

Yamagami A, Nagaoka N, Yoshihara K, Nakamura M, Shirai H, Matsumoto T, et al. Ultra-structural evaluation of an anodic oxidated titanium dental implant. *Dent Mater J*. 2014;33(6):828-34.

Yang CH, Li YC, Tsai WF, Ai CF, Huang HH. Oxygen plasma immersion ion implantation treatment enhances the human bone marrow mesenchymal stem cells responses to titanium surface for dental implant application. *Clinical Oral Implants Research*. 2015;(26):166–75. doi: 10.1111/clr. 12293.

Yang Y, Lai Y, Zhang Q, Wu K, Zhang L, Lin C, et al. A novel electrochemical strategy for improving blood compatibility of titanium-based biomaterials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;(79):309–13.

Zaatreh S, Wegner K, Strauß M, Pasold J, Mittelmeier W, Podbielski A, et al. Co-Culture of *S. epidermidis* and Human Osteoblasts on Implant Surfaces: An Advanced *in vitro* Model for Implant-Associated Infections. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151534.

Zepka S, Reis DAP, da Silva MM, Ueda M, Couto AA, Caliri FR, et al. Superficial Parameters Determination of the Ti-6Al-4V Alloy Submitted to PIII Treatment in Different Times of Implantation. *Design and Computation of Modern Engineering Materials, Advanced Structured Materials*. 2014;(54):375-81.

Zhao B, van der Mei HC, Rustema-Abbing M, Busscher HJ, Ren Y. Osteoblast integration of dental implant materials after challenge by sub-gingival pathogens: a co-culture study *in vitro*. *Int J Oral Sci*. 2015;7(4):250–8.

Zuo J, Huang X, Zhong X, Zhu B, Sun Q, Jin C, et al. A comparative study of the influence of three pure titanium plates with different micro- and nanotopographic surfaces on preosteoblast behaviors. *J Biomed Mater Res Part A*. 2013;101(11): 3278-84.

ANEXO A - Certificado de Qualidade



Certificado de Qualidade Nº.: 28064/16

Cliente : LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS

Pedido Cliente : FAPESP 201524986-8

Referências Internas: SANDINOX

Nota Fiscal Nº.: 9.965

Certificado de Origem Nº.: 1903 -

Liga / Material: Titânio	Especificações: ASTM F67-Gr4 e ISO 5832-2	Tratamento Térmico: Recozido			
Acabamento: Retificado	Produto (Estado Físico): Barra redonda	Dimensões (mm): Ø 12,70mm.	Tolerância: + 0,0 / - 0,043		
Comprimento (mm): 3200 A 3250	Peso: 0,78 KG	Quantidade: 1,00 metros			
Composição Química (%)		Corrida : H3913			
C	Fe	O	N	H	Ti
0,038	0,16	0,33	0,006	0,0018	saldo
Propriedades Mecânicas					
Alongamento: 24 %					
Escoamento: 628 MPa					
Resistência a Tração: 724 MPa					
Dureza: 21,0 HRC					
Tamanho de Grão - Conforme norma ASTM					
Obtido: 6					
Microestrutura					
MATERIAL LIVRE DE CAIXA-ALPHA					
Obs :					
Alguns dados foram extraídos do certificado de origem do fabricante da matéria prima.					

Data 08/09/2016 12:02:19

Depto. de Qualidade
Departamento de Qualidade
Sandinox Com. Imp. e Exp. Ltda