

RODRIGO PORTO GUIMARÃES

**SUPERFÍCIES DE TITÂNIO MODIFICADAS POR
VIDROS BIOATIVOS E HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO: *PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
IN VITRO***

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2020**

Rodrigo Porto Guimarães

**SUPERFÍCIES DE TITÂNIO MODIFICADAS POR
VIDROS BIOATIVOS E HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO: *PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
IN VITRO***

Tese apresentada ao colegiado de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Odontologia - área de Concentração em Clínica Odontológica.

**Orientador: Prof.: Dr. Allyson Nogueira Moreira
Coorientador: Prof.: Dr. José Augusto César
Discacciati**

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

G963s Guimaraes, Rodrigo Porto.
2020 Superfícies de titânio modificadas por vidros bioativos
T e hidróxido de potássio: produção, caracterização das
superfícies e avaliação biológica in vitro / Rodrigo Porto
Guimaraes. -- 2020.

165 f. : il.

Orientador: Allyson Nogueira Moreira.

Coorientador: José Augusto César Discacciati.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Implantação dentária. 2. Materiais biocompatíveis. 3.
Regeneração óssea. I. Moreira, Allyson Nogueira. II.
Discacciati, José Augusto César. III. Universidade Federal
de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

Elaborada por: Miriam Cândida de Jesus - CRB: 6/2727.

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



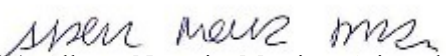
FOLHA DE APROVAÇÃO

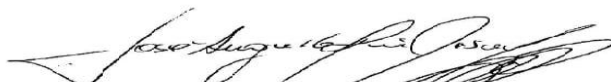
**SUPERFÍCIES DE TITÂNIO MODIFICADAS POR VIDROS BIOATIVOS E
HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DAS
SUPERFÍCIES E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO**

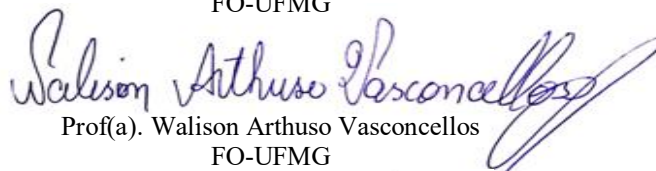
RODRIGO PORTO GUIMARÃES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor, área de concentração Clínica Odontológica.

Aprovada em 09 de junho de 2020, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Allyson Nogueira Moreira - Orientador
FO-UFMG


Prof(a). José Augusto César Discacciati
FO-UFMG


Prof(a). Walison Arthuro Vasconcellos
FO-UFMG


Prof(a). Guilherme Costa Carvalho Silva
UFMG


Prof(a). Vinicius Magalhães Barros
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais


Prof(a). Francisco Mauro da Silva Girundi
Newton de Paiva

Belo Horizonte, 9 de junho de 2020.

Defesa Homologada pela Pós-Graduação em Odontologia em 20 / 07 /2020.



Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Dedico esse trabalho aos meus pais (*in memoriam*), minha esposa e meus filhos por serem a luz Divina que alimenta a minha vida.

AGRADECIMENTO

Ao concluirmos uma meta de vida é importante agradecer àqueles que nos ajudaram, pois o sucesso vem sempre acompanhado de pessoas maravilhosas que nos deram as mãos durante o trajeto.

Agradeço à Deus, por ser meu caminho, minha verdade e minha vida. Aos meus pais, Mauro Greco Guimarães (*in memoriam*) e Hebe Porto Guimarães (*in memoriam*), dedico, especialmente, essa vitória. Vocês sempre serão a minha referência. Foi por vocês! À minha esposa, Cristiane, e meus filhos, Miguel e Alice, agradeço pela paciência e compreensão pelas ausências. Foi pra vocês! À minhas irmãs, Luciana Porto Guimarães e Janaina Porto Guimarães, pelo carinho e por saber que sempre poderei contar com vocês. Ao meu orientador, Professor Dr. Allyson Nogueira Moreira, por ter acreditado no meu projeto, pelas portas que me abriu dentro da FOUFG e pela oportunidade de me qualificar ao lado dos melhores pesquisadores do Brasil. Meus sinceros agradecimentos! Ao meu coorientador, Professor Dr. José Augusto César Discacciati, pela atenção doada às horas de correção da tese. Às professoras Dra. Kátia Lucy de Melo Maltos, Dra. Cinthia Mara da Fonseca Pacheco e à aluna de graduação Ana Flôr Sá por terem me acolhido com extremo carinho e compartilhado seus vastos conhecimentos na área de cultura celular. Com vocês aprendi que o conhecimento não deve caminhar junto à vaidade. O apoio que me deram foi fundamental para que eu pudesse cumprir minha missão. Às professoras do programa de pós-graduação da Faculdade de Odontologia na área de concentração em Clínica Odontológica, Dra. Claudia Silami de Magalhães e Dra. Mônica Yamauti por aprovarem minha admissão no curso de doutorado da UFG e compartilharem seus conhecimentos na área de pesquisa. À coordenadora do laboratório LaMPac do Departamento de Química da UFG, professora Dra. Rosana Zacarias Domingues e suas alunas de doutorado, Ludmila Gonçalves de Oliveira Xavier e Rosângela Maria Ferreira Costa e Silva, pela parceria no desenvolvimento e síntese dos vidros bioativos. Ao coordenador do Laboratório de Física de Superfícies do Departamento de Física da UFG, professor Dr. Vagner Eustáquio de Carvalho e seu aluno de doutorado Clóvis Guerim Vieira, pela parceria nas análises por XPS. Ao coordenador do Laboratório Sala Limpa do Departamento de Física da UFG, professor Dr. Daniel Cunha Elias e ao técnico Antônio de Pádua de Assis, pela

parceria nas análises por perfilometria. Ao prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra, do Departamento de Química, por ter disponibilizado os equipamentos para as análises de hidrofiliabilidade de superfície. Ao prof. Paulo Tamasco da USP-Ribeirão Preto, por ter gentilmente cedido células pré-osteoblásticas imortalizadas (MC3T3-E1, subclone 14). Ao Centro de Microscopia da UFMG e seus funcionários, pela disponibilidade em executar as análises físico químicas e revelação das imagens das amostras. À empresa PEC-LAB Sistema de Implantes, pela fabricação dos discos de titânio. À todos os meus colegas do Curso de Doutorado da FOUFG. À FAPEMIG pelo apoio financeiro (APQ-00542-14) (APQ-01837-16).

“Sim, Deus é minha salvação! Eu confio e nada tenho a temer, porque minha força e meu canto é Javé: ele é a minha salvação.”

Isaías 12:2

RESUMO

Apesar do consolidado sucesso dos implantes dentários em condições de normalidade, alguns desafios biológicos requerem uma maior reatividade da superfície de implantes. A osseointegração é um processo decorrente de estímulos físicos, químicos e biológicos de complexa interrelação, que podem ser modificados para uma melhor performance. Buscando melhor desempenho em situações metabólicas desfavoráveis ou regiões de pobre qualidade óssea, é defendido o revestimento da superfície de titânio com materiais mais bioativos a fim de acelerar a fixação e diferenciação celular, e conseqüente aposição óssea. Esse estudo experimental *in vitro* teve como objetivo sintetizar, caracterizar e testar a capacidade de osseointegração de novos materiais compostos de vidro bioativo. Para isso, discos de titânio, grau 4, tiveram a superfície tratada por jateamento com óxido de alumínio e duplo ataque ácido (HNO_3/HF) (grupo I – “T”). As superfícies tratadas do titânio foram revestidas pelo processo de imersão controlada em dip-coating com dois novos materiais à base de vidro bioativo sintetizados pela rota solgel em baixas temperaturas (grupos III, IV e V – “TEOS, TEOS+KOH, BIOV”, respectivamente). Por fim, dois grupos receberam uma imersão de solução básica de KOH (grupos II e IV – “T+KOH, TEOS+KOH”). Os métodos de caracterização topográfica foram executados por técnicas de análise de rugosidade (S_a e RMS) pelo perfilômetro óptico 3D e microscopia eletrônica de varredura (MEV); análise de hidrofiliçidade pelo método de gota séssil; e mensuração da espessura do revestimento pelo microscópio eletrônico de transmissão (MET). As caracterizações químicas foram realizadas por meio de MEV+ espectrômetro de raio X por dispersão de energia (EDS); MET+EDS; e espectroscopia de fotoelétrons excitado por raios x (XPS). Análises biológicas *in vitro* utilizando células pré-osteoblásticas imortalizadas da calvária de camundongos neonatos MC3T3 foram realizadas por ensaios de viabilidade celular (MTT – 24 horas e 7 dias); ensaio de mineralização (alizarina – 21 dias); e avaliação de morfologia celular por imagens de MEV+EDS (7 e 14 dias). O efeito dos fatores em estudo, na rugosidade e hidrofiliçidade da superfície, foi verificado por ANOVA e teste *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na avaliação da rugosidade aritmética (S_a) e da rugosidade quadrática média (RMS). Os resultados dos testes de hidrofiliçidade de superfície mostraram maior molhabilidade para a superfície de vidro bioativo do grupo BIOV ($P < 0,05$). Os ensaio de MTT em 24 horas e 7 dias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os grupos TEOS+KOH e BIOV obtiveram os melhores resultados para o ensaio de mineralização após 21 dias de cultura celular. Conclui-se que as superfícies testadas apresentaram-se viáveis e não citotóxicas para o crescimento de células osteoblásticas MC3T3. Os quatro grupos testados, T+KOH, TEOS, TEOS+KOH e BIOV apresentaram respostas biológicas positivas de mineralização, crescimento e multiplicação celular. Os revestimentos de vidro bioativo, independentemente da via de síntese, apresentaram resultados significativamente melhores do que as superfícies de titânio sem revestimento de vidro bioativo.

Palavras-chave: Implantação dentária. Materiais biocompatíveis. Regeneração óssea.

ABSTRACT

Titanium surfaces modified by bioactive glasses and potassium hydroxide: production, surface characterization and in vitro biological evaluation

Despite the consolidated success of dental implants under normal conditions, some biological challenges require a higher reactivity of the implant surface. Osseointegration is a process due to physical, chemical and biological stimuli of complex interrelationships, which can be modified for better performance. Seeking better performance in unfavorable metabolic situations or regions of poor bone quality, the coating of the titanium surface with more bioactive materials is advocated in order to accelerate cell attachment and differentiation, and consequent bone apposition. This in vitro experimental study aimed to synthesize, characterize and test the osseointegration capacity of new bioactive glass composite materials. For this, titanium discs, grade 4, had the surface treated by blasting with aluminum oxide and double acid attack (HNO_3 / HF) (group I - "T"). The treated surfaces of the titanium were coated by the dip-coating controlled immersion process with two new bioactive glass-based materials synthesized by the route sol-gel at low temperatures (groups III, IV and V - TEOS, TEOS + KOH, BIOV, respectively). Finally, two groups received an immersion of basic KOH solution (groups II and IV - "T + KOH, TEOS + KOH"). The topographic characterization methods were performed by roughness analysis techniques (S_a and RMS) by 3D optical profilometer and scanning electron microscopy (SEM); hydrophilicity analysis by sessile droplet method; and thickness measurement of the coating by the transmission electron microscope (TEM). The chemical characterization was performed by MEV + energy dispersive X-ray spectrometer (EDS); TEM + EDS; and x-ray excited photoelectron spectroscopy (XPS). In vitro biological analyzes using immortalized pre-osteoblastic calvarial cells from MC3T3 neonates were performed by cell viability assays (MTT - 24 hours and 7 days); mineralization test (alizarin - 21 days); and evaluation of cell morphology by SEM and EDS images (7 and 14 days). The effect of the factors under study, surface roughness and hydrophilicity was verified by ANOVA and Tukey post-hoc test ($p \leq 0.05$). There was no statistically significant difference between the groups in the evaluation of arithmetic roughness (S_a) and mean square roughness (RMS). The results of the surface hydrophilicity tests showed greater wettability for the bioactive glass surface of the BIOV group ($P < 0.05$). The 24-hour and 7-day MTT assay did not show statistically significant differences between the groups. The TEOS + KOH and BIOV groups obtained the best results for the mineralization assay after 21 days of cell culture. It is concluded that the surfaces tested were viable and non-cytotoxic for growth of MC3T3 osteoblastic cells. The four groups tested, T + KOH, TEOS, TEOS + KOH and BIOV presented positive biological responses of mineralization, growth and cell multiplication. Bioactive glass coatings, regardless of the synthetic pathway, showed significantly better results than uncoated titanium surfaces of bioactive glass.

Key words: Dental implantation. Biocompatible materials. Bone regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - (a,b,c,d) : Etapas de produção de lamelas das amostras utilizando-se feixe focalizado de íons.	47
Figura 2 - Representação fotográfica da formação do ângulo de contato formado entre a gota de água destilada e a superfície do disco.	49
Figura 3a e b – Rugosidade aritmética (S_a) e rugosidade quadrática média (RMS) das superfícies dos grupos I, II, III, IV e V. Não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos I, II, III, IV e V ($p > 0,05\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey).	54
Figura 4 - Grupo I (T) – Aumento de 5000X (a), 10000X (b), 20000X (c) e 40000X (d)	56
Figura 5 - Grupo II (T+KOH) – Aumento de 5000X (A), 10000X (B), 20000X (C) e 40000X (D).....	57
Figura 6 - Grupo III (TEOS) – Aumento de 5000X (A), 10000X (B), 20000X (C) e 20000X (D).....	58
Figura 7 - Grupo IV (TEOS+KOH) – Aumento de 5000X (A), 10000X (B), 20000X (C) e 50000X (D).....	59
Figura 8 - Grupo V (BIOV) – Aumento de 5000X (A), 10000X (B), 20000X (C) e 40000X (D)	60
Figura 9 - Espectros de perda de energia de elétrons próximo à estrutura de borda (ELNES) da borda estendida L do Si, Si L _{2,3} (2p), para amostras de Si puro padrão*, SiO ₂ padrão*, e o espectro experimental do vidro bioativo. O deslocamento químico de aproximada 6 eV da borda L do Si do vidro bioativo em relação ao SiO ₂ e as diferentes razões entre as bandas L ₃ e L ₂ (L ₃ /L ₂) indicam que o Si tem diferentes estados de oxidação em cada uma dessas três espécies. *Fonte: http://www.eels.info/atlas/silicon , acessado em 24/03/2019.....	61
Figura 10 - Imagens de MET em campo claro das lamelas das amostras dos grupos T (a) e T+KOH (b) e espectros de EDS (c,d) referentes aos pontos “1 EDS” indicados nas imagens a e b, respectivamente.....	62
Figura 11 - (a) Imagem de MET em campo claro da amostra do grupo (TEOS); (b) espectro de EEL do biovidro feito no ponto 1 indicado na imagem à esquerda; (c) perfil de contagem de sinal de Si e de Ti por EELS ao longo da linha perpendicular ao biovidro mostrada na imagem à esquerda.	63

Figura 12 - (a) Imagem de MET em campo claro da amostra do grupo (TEOS+KOH), mostrando o perfil de contagem de sinal de Si e de Ti por EELS ao longo da linha perpendicular ao biovidro; (b,c) espectros de EDS dos pontos 1 e 2 mostrados na imagem à esquerda.....	63
Figura 13 - (a) Imagem de MET em campo claro da amostra do grupo (BIOV), mostrando o perfil de contagem de sinal de Si e de Ti por EELS ao longo da linha perpendicular ao biovidro; (b,c) espectros de EDS dos pontos 1 e 2 mostrados na imagem à esquerda, respectivamente.	64
Figura 14 - Grupo I - Mapa de espectroscopia de raio x	64
Figura 15 - Grupo II - Mapa de espectroscopia de raio x	64
Figura 16 - Grupo III- Mapa de espectroscopia de raio x	65
Figura 17 - Grupo IV- Mapa de espectroscopia de raio x.....	65
Figura 18 - Grupo V- Mapa de espectroscopia de raio x.....	65
Figura 19 - Espectro XPS de baixa resolução da amostra do grupo I (T)	66
Figura 20 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra do grupo I (T).....	67
Figura 21 - Espectro XPS de alta resolução da amostra do grupo I (T) na faixa de energia do titânio 2p.....	67
Figura 22 - Espectro XPS de alta resolução da amostra do grupo I na faixa de energia do carbono 1s.....	68
Figura 23 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra T+KOH	69
Figura 24 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do silício 2p da amostra T+KOH	70
Figura 25 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do carbono 1s da amostra T+KOH	70
Figura 26 - Espectro XPS de baixa resolução da amostra do grupo TEOS	71
Figura 27 - Espectro XPS de alta resolução da amostra do grupo TEOS na faixa de energia do silício 2p	72
Figura 28 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra do grupo TEOS	72
Figura 29 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do carbono 1s da amostra do grupo TEOS	73

Figura 30 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do titânio 2p da amostra do grupo TEOS	73
Figura 31 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra TEOS+KOH.....	75
Figura 32 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do silício 2p da amostra TEOS+KOH.....	75
Figura 33 - Espectro XPS de baixa resolução da amostra do grupo BIOV	76
Figura 34 - Espectro XPS de alta resolução da amostra do grupo BIOV na faixa de energia do silício 2p	77
Figura 35 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra do grupo BIOV.....	77
Figura 36 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do carbono 1s da amostra do grupo BIOV.....	78
Figura 37 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do titânio 2p da amostra do grupo BIOV.....	78
Figura 38 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do cálcio 2p da amostra do grupo BIOV.....	79
Figura 39 - Ângulo de contato entre a gota de água destilada e a superfície das amostras dos grupos I, II, III, IV, e V nos tempos de 1, 120 e 180 segundos.	80
Figura 40 - Ângulo de contato médio dos grupos I, II, III, IV e V. ANOVA - Tukey's multiple comparisons test **p<0,001	80
Figura 41 - Viabilidade celular de osteoblastos cultivados em 24 horas e 7 dias nos grupos controle, T, T+KOH, TEOS, TEOS+KOH, BIOV, medida em absorbância....	81
Figura 42 - Mineralização da matriz, corada por vermelho de alizarina (concentração do corante em µM) após 21 dias de cultura de osteoblastos nos grupos T, T+KOH, TEOS, TEOS+KOH e BIOV.	82
Figura 43 A, B, C, D, E, F- Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo I (T) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F). ...	84
Figura 44 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo I).	85
Figura 45 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo I (T).....	85

Figura 46 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo II (T+KOH) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).	86
Figura 47 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo II).	87
Figura 48 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo II (T+KOH).	87
Figura 49 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo III (TEOS) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).	88
Figura 50 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo III).	89
Figura 51 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo III (TEOS).	89
Figura 52 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo IV (TEOS+KOH) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).	90
Figura 53 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo IV).	91
Figura 54 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo IV (TEOS+KOH).	91
Figura 55 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo V (BIOV) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1300X (C), 2600X (D), 5000X (E) e 10000X(F).	92
Figura 56 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo V).	93
Figura 57 Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo V (BIOV).	93
Figura 58 A, B, C, D, E, F- Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo I (T) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F). ...	94

Figura 59 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo I).	95
Figura 60 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo I (T).	95
Figura 61 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo II (T+KOH) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).	96
Figura 62 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo II).	97
Figura 63 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo II (T+KOH).	97
Figura 64 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo III (TEOS) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).	98
Figura 65 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo III).	99
Figura 66 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo III (TEOS).	99
Figura 67 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo IV (TEOS+KOH) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).	100
Figura 68 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo IV).	101
Figura 69 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo IV (TEOS+KOH)	101
Figura 70 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo V (BIOV) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).	102
Figura 71 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo V).	103
Figura 72 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo V (BIOV).	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios dos parâmetros de rugosidade aritmética (S_a) e rugosidade quadrática média (RMS) em escala micrométrica (μm), por grupo experimental.....54

Tabela 2 - Espessura da cobertura de vidro bioativo dos grupos III, IV e V.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP Fosfatase alcalina

ASTM American Society for Testing and Material

BCIP-NBT 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyphosphate – nitrobluetetrazolium

BCP Fosfato de cálcio bifásico

BMP Proteína morfogenética óssea

Ca Cálcio

CaCl₂ Cloreto de cálcio

CaCO₃ Carbonato cálcio

CaP Fosfato de cálcio

CDTN Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

Cl Cloro

CO₂ Dióxido de carbono

Cm² Centímetro quadrado

DMEC Departamento de engenharia de materiais e construção

DRX Difração de raio x

EDS Espectrômetro de raio x por dispersão de energia

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

eV Elétron-volt

FTIR Espectroscopia de infravermelho

FIB Feixe de íons focalizado

HA Hidroxiapatita

HCA Apatita hidroxi-carbonatada

HCL Ácido clorídrico

HF Ácido Fluorídrico

HNO₃ Ácido Nítrico

IGF-II Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-II

KeV kiloelectron Volt

Kg Quilo

KGy Quilogray

KOH Hidróxido de Potássio

KV Quilovolt

LaMPaC Laboratório de Materiais e Pilhas a Combustível

M Molar

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

MET Microscópio Eletrônico de Transmissão

Mg Miligrama

ml Mililitro

mm Milímetro

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazoliumbromide

Na Sódio

nA Nanoampère

nm Nanômetro

OH Hidroxila

P Fósforo

PBS Tampão Fosfato Salino

pH Potencial Hidrogênico

ppm Partes por Milhão

RMS Rugosidade Quadrática Média

RPM Rotações por Minuto

Sa Rugosidade Aritmética

SBF Fluido Corpóreo Simulado

Si Sílica

SiO₂ Sílica

SiOH Silanol

TEOS Tetraetil Ortosilicato

TGF-β Fator de Crescimento Transformador β

Ti Titânio

TiO₂ Dióxido de Titânio

Ti₂O₃ Óxido de Titânio

XPS Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios X

αMEM Minimum Essential Medium α

μL Microlitro

μm Micrômetro

μM Micromolar

μg Micrograma

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca registrada

μ Micro

β Beta

α Alfa

% Porcentagem

°C Graus Celsius

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 METODOLOGIA EXPANDIDA	42
4.1 Delineamento de estudo	42
4.2 Grupos Experimentais	42
4.3 Métodos de produção das superfícies	43
4.3.1 Preparo do substrato (superfície de Titânio)	43
4.3.2 Síntese dos vidros bioativos	44
4.3.2.1 Síntese do vidro bioativo pela rota sol-gel via hidrólise e condensação de precursor químico alcóxido (TEOS)	44
4.3.2.2 Síntese do vidro bioativo pela rota sol-gel via gelificação de suspensão coloidal	44
4.3.3 Técnica de recobrimento da superfície de titânio por vidros bioativos	45
4.3.4. Deposição do composto químico hidróxido de potássio (KOH)	45
4.4 Técnicas de caracterização	46
4.4.1 Avaliação da rugosidade de superfície (Perfilômetro Óptico 3D)	46
4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
4.4.3 Espectrômetro de Raio X por dispersão de energia (EDS)	47
4.4.4 Microscópio Eletrônico de Varredura FEG com Sistema de Nanofabricação FIB - Quanta FEG 3D FEI	47
4.4.5 Microscópio eletrônico de Transmissão (MET)	48
4.4.6 Espectroscopia de Fotoelétrons excitado por Raio X (XPS)	48
4.4.7 Hidrofilicidade da superfície	48
4.5 Estudo experimental <i>in vitro</i>	49

4.5.1 Cultura de células	50
4.5.2 Recuperação e expansão das células.....	50
4.5.3 Plaqueamento das células	51
4.5.4 Ensaio de viabilidade celular MTT.....	51
4.5.5 Ensaio de mineralização.....	52
4.5.6 Avaliação Morfológica	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 Rugosidade das superfícies.....	54
5.2 Caracterização microestrutural da topografia de superfície por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
5.3 Análise de espessura e composição química dos filmes de recobrimento realizados pelo MET (Microscopia eletrônica de transmissão).....	61
5.4 Análise de composição química realizada por Espectroscopia de Raio X por Dispersão em Energia (EDS) no MEV	64
5.5 Espectroscopia de Fotoelétrons excitado por Raio X (XPS)	66
5.6 Hidrofilicidade de superfície	79
5.7 Ensaio de viabilidade celular (MTT)	80
5.8 Ensaio de Mineralização (Alizarina)	81
6 DISCUSSÃO	104
7 CONCLUSÃO	111
8 ARTIGOS CIENTÍFICOS	112
REFERÊNCIAS.....	157
PRODUÇÃO CIENTÍFICA (2016-2019)	163

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A reabilitação oral utilizando implantes endósseos é amplamente aceita como uma terapêutica que cumpre de forma satisfatória os desafios clínicos no tratamento de pacientes desdentados. Porém, isso não seria possível sem o estabelecimento do fenômeno da osseointegração, definido como uma união direta, durável e funcional entre osso e superfície do implante (BRANEMARK, 1983).

A cicatrização do tecido ósseo ao redor do implante dentário é coordenada e organizada, sequencialmente, por um complexo processo de comunicação intercelular que acontece por meio de moléculas decifradas por receptores celulares. O conhecimento das relações entre os mediadores e os principais elementos celulares é fundamental para direcionar novos alvos na melhoria da terapia com implantes dentários (TERHEYDEN *et al.*, 2012).

Desde o começo da década de 80, o “design” da superfície dos implantes já era considerado um dos fatores mais relevantes para o processo de osseointegração. Ao longo dos anos, um grande número de experimentos tem demonstrado claramente que características físicas, como rugosidade; e químicas, como os tipos de tratamentos aplicados à superfície, são os aspectos mais importantes na estimulação biológica (WENNERBERG and ALBREKTSSON, 2009).

Atualmente, existem vários tipos de tratamentos que modificam as propriedades físicas, químicas e biológicas da superfície dos implantes. Um conceito altamente promissor direciona-se na formulação de superfícies bioativas híbridas, baseado na incorporação de componentes orgânicos e inorgânicos capazes de estimular a neoformação óssea ao redor de implantes dentários (ANITUA *et al.*, 2015).

Componentes orgânicos, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), ligam-se a receptores de células precursoras ósseas, ativando genes responsáveis pela produção de osteopontina, de fosfatase alcalina ou de colágeno tipo I (TERHEYDEN *et al.*, 2012). Alguns íons, como Ca, P e Si na superfície do titânio, também favorecem a atividade celular, influenciando a adsorção de proteínas e a fixação celular, aumentando a expressão genética de osteoblastos (SURMENEV, SURMENEVA and IVANOVA, 2014).

Um estudo, ao evidenciar a ligação iônica de macro moléculas de albumina tanto em superfície de TiO₂, quanto em hidroxiapatita óssea, sugere que a

biocompatibilidade da superfície do implante ao tecido ósseo está associada a interações eletrostáticas entre o oxigênio, na forma aniônica, presente em ambas superfícies (titânio e hidroxiapatita) e os cátions Ca^{+2} ligados a grupos carboxil, fosfato ou sulfato dessas macro moléculas protéicas (ELLINGSEN, 1991).

Tang *et al.* (2010) observaram uma maior bioatividade da superfície do titânio coberta com sílica com hidroxiapatita (SiHA) comparada com hidroxiapatita (HA). Tal fato pode ser explicado pela incorporação de íons silicato, o que criaria sítios de hidroxilas disponíveis para reagirem, diminuindo a estabilidade da estrutura e aumentando a reatividade. Os autores acreditam que a substituição dos íons PO_4^{-3} por SiO_4^{-4} cria uma superfície mais eletronegativa, facilitando a dissolução da HA e consequentemente aumentando a bioatividade.

Li *et al.* (1994) mostraram que em superfícies carregadas negativamente, como sílica e titânio, preparados pelo método sol-gel, ocorreu precipitação de HCA, sendo que o mesmo não aconteceu para superfícies positivas, como as de alumina. Uma das causas está na densidade de grupos silanol (SiOH) e na velocidade que o substrato é hidrolisado e dissolvido para que haja liberação de SiOH na sua superfície. Claramente, a formação da apatita está associada com superfícies carregadas negativamente, assim como a abundância de grupos OH liberados em solução.

Xynos *et al.* (2000a) mostraram que a troca iônica que acontece na interface entre a superfície bioativa e a solução em contato é responsável pela dissolução da rede e contribui para o processo de absorção dos materiais. As soluções formadas contendo alta concentração de Si dissociada estimulam a atividade mitótica de osteoblastos. Os dados da pesquisa sugerem que a dissolução iônica dos produtos do biovidro 45S5® pode aumentar a disponibilidade de IGF-II nos osteoblastos, sendo responsável pela proliferação desses.

Keeting *et al.* (1992), analisando a ação dos zeólitos, membros da família de sólidos microporosos aluminossilicatados, em células osteoblásticas humanas, relataram a ocorrência de uma potente estimulação mitótica, de diferenciação celular e de aumento da expressão de genes e da liberação de $\text{TGF-}\beta$. Os achados confirmaram a indução da osteogênese pelo silício. Vale ressaltar que o silício é um componente utilizado na maioria dos meios para crescimento de células *in vitro*, incluindo células ósseas (KEETING *et al.*, 1992).

Segundo Böhner (2009), não está devidamente claro como o silício ligado à HA ou ao fosfato de cálcio influencia positivamente na resposta biológica destes

compostos. É certo que, qualquer íon liberado durante o processo de reabsorção e substituição óssea deve ser visto como uma droga, e suas biodisponibilidades e níveis terapêuticos devem ser considerados quando discutidos resultados *in vivo*.

Vidros bioativos possuem propriedades osteogênicas. Culturas de osteoblastos humanos em vidros bioativos são capazes de produzir matriz colágena extracelular sem suplementos hormonais aos meios de cultura. A liberação de íons cálcio e adição de sílica pela dissolução do vidro bioativo estimula a atividade mitótica e a produção de fatores de crescimento e de matriz colágena extracelular. Outras biocerâmicas necessitam de adição de suplementos osteogênicos ao meio de cultura (JONES, 2012). Um estudo mostra que, em cultura primária de osteoblastos, em meio de solução iônica produzida pelo biovidro 45S5®, ao menos sete famílias de genes foram estimuladas em um período de 48 horas (XYNOS *et al.*, 2001).

A habilidade do vidro bioativo estimular a regeneração óssea a nível celular é dependente dos níveis de dissolução e formação da camada de hidroxiapatita, o que pode ser controlada pela composição do vidro bioativo e pela temperatura de sinterização (JONES, 2012; PEREIRA, CLARK, and HENCH, 1995). A expressão dos genes das células ósseas é dose dependente e possui um nível ótimo de expressão compreendido em uma taxa de solubilidade de $20\mu\text{g ml}^{-1}$ para sílica e $60\text{-}90\mu\text{g ml}^{-1}$ para íons cálcio (HENCH, 2009). Cada íon possui uma função individual na regulação dos genes. Íons cálcio extracelulares são associados ao aumento da produção de IGF-II (Maeno *et al.* 2005) e de glutamato por osteoblastos (VALERIO *et al.*, 2009). Prevê-se que a sílica seja liberada do vidro na forma de ácido silícico, estimulando a produção de colágeno tipo I pelos osteoblastos (REFFITT *et al.*, 2003).

Propriedades do vidro bioativo, como taxa de dissolução e velocidade de formação da apatita hidroxicarbonatada (HCA) são resultantes da estrutura atômica (MARTIN *et al.*, 2012). A conectividade das ligações de Si é ditada pela composição e pelo método de síntese dos vidros. Os vidros de silicato são formados por união de várias sílicas tetrahédricas conectadas por pontes de oxigênio. O silício é portanto o átomo formador das ligações do vidro. Alto conteúdo de sílica resulta em ligações fortemente conectadas contendo uma grande proporção de pontes de oxigênio com baixa dissolução (MERCIER *et al.*, 2011).

Vidros produzidos pelo método sol-gel possuem uma menor conectividade de ligações quando comparados aos vidros derivados pelo método de fusão. Esta redução na conectividade da rede em combinação com sua nanoporosidade inerente

explica por que vidros produzidos pelo método sol-gel podem ser bioativos com até 90% mol de sílica, enquanto os vidros derivados da fusão estão limitados a 60% mol (PEREIRA, CLARK and HENCH, 1995). O teor de OH no vidro sol-gel depende das condições utilizadas em síntese, como a estabilização final ou a temperatura de sinterização. A sinterização de vidros pelo método sol-gel acima de sua temperatura de transição causam redução na porosidade e densificação da rede de sílica. A temperatura de sinterização deve ser mantida abaixo da temperatura de cristalização para o vidro, a fim de se evitar a formação de um vidro cerâmico (LIN *et al.*, 2009).

Embora, o excelente nível de sucesso das superfícies de titânio seja sedimentado na literatura, existem alguns desafios biológicos como condições metabólicas desfavoráveis ou regiões de pobre qualidade óssea onde uma maior bioatividade da superfície seja desejada. Buscando melhor performance clínica, é defendido o revestimento da superfície de titânio com materiais mais reativos a fim de acelerar a fixação e diferenciação celular, e consequente aposição óssea. A literatura científica sugere uma maior bioatividade para vidros sintetizados pela técnica sol-gel em condição de baixas temperaturas de transição, mantendo presente os grupos hidroxila para agir como agentes modificadores. Dentro dessas condições expostas, o presente estudo produziu, caracterizou e avaliou a resposta biológica de diferentes recobrimentos à base de sílica via rota sol-gel e imersões em solução básica de hidróxido de potássio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As características positivas de biocompatibilidade, espessura do filme de óxido de titânio, composição química, topografia, energia de superfície, resistência mecânica e corrosiva, além de outras propriedades que estimulam a osseointegração fazem com que os implantes dentais fabricados em titânio tenham efetiva aplicação na substituição de dentes ausentes (GAVIRIA *et al.*, 2014).

O elevado índice de sucesso dos implantes dentais sugere êxito em diferentes tipos de tratamento de superfície dos mesmos. A morfologia da superfície dos implantes se relaciona ao metabolismo ósseo, estimulando a fixação de células ósseas, crescimento, diferenciação, e aumento de mineralização (NOVAES JR *et al.*, 2010).

De acordo com a classificação de rugosidade superficial, Albrektsson e Wennerberg (2009) consideraram a rugosidade moderada sobre a superfície de titânio (Sa entre 1,0 e 2,0 μm) como o melhor perfil topográfico a apresentar estímulos positivo ao tecido ósseo. Após inúmeras investigações experimentais, os autores consideraram que a resposta óssea também pode ser influenciada por modificações da superfície, que não são refletidas exclusivamente pelas alterações de rugosidade, mas, por mudanças físicas e químicas que podem ocorrer simultaneamente, mesmo que despropositadas.

Um material bioativo é aquele capaz de desencadear respostas biológicas específicas, as quais resultam na formação de uma ligação interfacial entre o tecido adjacente e o material. Essa ligação se dá pela equivalência química e estrutural da fase de apatita hidróxi-carbonatada (HCA), que se forma na superfície dos implantes, e presente na estrutura mineral óssea. (HENCH *et al.*, 2000)

A resposta celular ao biomaterial incorporado à superfície de titânio é influenciada por algumas propriedades inerentes à superfície, como a composição química, rugosidade, cristalinidade, energia superficial, hidrofiliabilidade, entre outras. Essas características influenciam diretamente o comportamento das células osteogênicas, pois modificam a adsorção de proteínas que intermediam a interação celular à superfície (SURMENEV, SURMENEVA, and IVANOVA, 2014).

Apesar de, na atualidade, vários revestimentos de implantes terem sido propostos, nem todos conseguem se reafirmar nos estudos de longo prazo, tendo resultados conflitantes com a teoria. Isso acontece porque a osseointegração é um

processo dinâmico e contínuo, dependente de uma cascata de reações químicas e de propriedades físicas da superfície que se modificam com o tempo. Entre as inovações, o recobrimento de superfícies com vidro bioativo tem tido resultados promissores, equiparáveis aos recobrimentos de hidroxiapatita (HA) (XUEREB, CAMILLERI and ATTARD, 2015).

Embora o vidro bioativo e a HA serem materiais bioativos, existem diferenças de classificação em relação as suas bioatividades. Materiais bioativos classe A, na qual o vidro bioativo se encontra, são capazes de se ligar a tecidos duro e mole, apresentam osteoprodutividade e condutividade, rápidas reações superficiais e são totalmente substituídos por novo tecido ósseo. Materiais bioativos classe B, caso da HA, se ligam somente a tecidos duros, são exclusivamente osteocondutores, de lenta reabsorção e mínima liberação iônica. Essas dessemelhanças são devidas as grandes diferenças nas taxas de reações das superfícies, controladas pela reação cinética do material. Em consequência dessas disparidades, a velocidade e quantidade de formação de novo osso são maiores para os materiais bioativos da classe A (HENCH, 2000; HENCH *et al.*, 2000).

A hidroxiapatita e outros revestimentos de fosfato de cálcio (CaP) tem sido uma das coberturas mais estudadas e pesquisadas, tendo tido significativo efeito no processo de regeneração óssea. O interesse nos revestimentos a base de CaP vem da sua similaridade química ao osso natural. Essa característica biomimética concede boa propriedade osteocondutora ao biomaterial. Entretanto, outros estudos apresentam resultados conflitantes, mostrando efeitos não significativos ou mesmo negativos, principalmente na avaliação da estabilidade a longo prazo (SURMENEV, SURMENEVA and IVANOVA, 2014; NOVAES *et al.*, 2010).

Em uma análise sistemática de resultados experimentais *in vitro*, *in vivo* e estudos clínicos de superfícies de implantes cobertos com hidroxiapatita, os resultados mostraram benefícios do revestimento em relação as superfícies rugosas não revestidas. Porém, a heterogeneidade das metodologias dificulta um resultado conclusivo. Não é possível definir qual o fator mais relevante para o estímulo à osseointegração, se é rugosidade superficial, porosidade, topografia, hidrofiliabilidade, espessura da cobertura ou a técnica utilizada para o revestimento da superfície (SURMENEV, SURMENEVA and IVANOVA, 2014).

Diferente da osseointegração, onde o crescimento ósseo acontece diretamente sobre a superfície de titânio, na biointegração das superfícies revestidas

com CaP, o fenômeno é de contiguidade das estruturas moleculares da superfície de implante no sentido ósseo, sem descontinuidade. Esse processo dependente da degradação química da superfície bioativa gera a integração da superfície ao osso circundante (YAZDANI *et al.*, 2018).

O fenômeno da biointegração começou a ser desejado a partir 1967, diante da situação exposta pelo coronel Klinker de que a guerra do Vietnã havia deixado inúmeros soldados amputados e que as próteses metálicas ou plásticas disponíveis aos cirurgiões eram rejeitadas pelo corpo. O Biovidro® surgiu da seguinte questão: descobrir um material que não formasse um tecido cicatricial na interface prótese-osso, mas em vez disso, uma ligação com o tecido hospedeiro. A partir desse pensamento, levantou-se a seguinte hipótese: se o osso é composto de fosfato de cálcio hidratado, então, qualquer material que seja capaz de formar uma camada de HA in vivo, não será rejeitado pelo corpo (HENCH, 2006).

As primeiras pesquisas sobre a ligação da superfície de biovidro® ao osso foram publicadas em 1971 no periódico "Biomedical Materials Research". Os resultados mostraram uma rápida formação de cristais de HA na superfície do biovidro® ligada a uma camada de fibras colágenas produzida na interface pelos osteoblastos (HENCH, 2006).

Durante os anos iniciais da descoberta do biovidro®, questões foram levantadas suscitadas pela descoberta de que a união entre interfaces ocorreria entre tecidos vivos e superfícies não vivas, como as de implantes. Entre essas questões, estavam a indagação de qual era a natureza física, química e biológica da ligação, quais mecanismos de reação estavam envolvidos, qual a resistência mecânica e qual o tempo para formação dessa união (HENCH, 2006).

A partir daí vieram inúmeras pesquisas para responder essas questões. Materiais bioativos desenvolvem uma interface de adesão com o tecido, resistente as forças mecânicas. Em muitos casos, a força de adesão dessa interface é superior a força coesiva para fratura do material de implante ou do tecido ósseo (YAMAMURO 2016). Uma avaliação quantitativa da força de cisalhamento interfacial em modelos de ratos e de macacos demonstraram que a resistência da ligação interfacial entre Bioglass® e osso cortical foi igual ou maior do que a força do osso hospedeiro. Aparentemente, a integridade estrutural da camada de transição formada por SiO₂ (Bioglass®) : CaP(osso) é responsável pela alta resistência tensional da interface biovidro-osso (HENCH, 2006; HENCH *et al.*, 1977; PIOTROWSKI *et al.*, 1975).

Um estudo avaliou a força de adesão do vidro cerâmico A-W com a superfície do osso cortical em tíbias de coelhos em 2, 4, 8 e 25 semanas. Os resultados mostraram que as forças de tensão e cisalhamento aumentaram consideravelmente a partir da quarta semana. A força de adesão não diferiu significativamente entre a oitava e a vigésima quinta semana. Portanto, concluíram que a formação da camada de adesão entre o vidro cerâmico e o osso foi concluída na oitava semana. Em alguns casos, a partir da oitava semana, o resultado da força de tensão necessária para separar o osso do vidro cerâmico, gerou uma linha de fratura localizada exclusivamente no tecido ósseo. Isso sugere que a força de ligação formada entre o tecido ósseo e o vidro cerâmico foi maior que a resistência do próprio osso. Os achados indicaram que uma área de contato de ligação química de apenas 2,54 cm² suporta uma carga superior a 100 kg (YOSHII *et al.*, 1988).

Existem dois mecanismos pelos quais o vidro bioativo estimula a osteogênese e se liga ao osso. A dissolução dos produtos da camada de vidro estimula geneticamente o processo de mitose, diferenciação e produção de matriz óssea pelas células ósseo progenitoras. Além disso, a formação da camada de HCA é responsável pela ligação ao osso por meio de fibrilas de colágeno e fixação das células ósseo progenitoras (JONES, 2012).

A camada de HCA se forma pela dissolução do vidro por meio de um mecanismo similar ao processo de corrosão. A medida que a superfície do vidro solubiliza, os produtos da dissolução alteram a composição química e o pH do meio, proporcionando locais de superfície e pH favoráveis para a nucleação de HCA. A sequência da formação de HCA se dá inicialmente pela troca iônica de Si, Na, Ca e P do vidro pelo H⁺ da solução, criando ligações silanol (Si-OH) na superfície do vidro. O aumento do pH local leva ao ataque das ligações de sílica do vidro pelo grupo OH⁻, quebrando a ligação O-Si-O. A sílica solúvel é perdida na forma de Si(OH)₄ para a solução, deixando mais silanol (SiOH) na interface vidro-solução. Ocorre então a condensação dos grupos silanol próxima a superfície do vidro e repolimerização da camada rica em sílica. Grupos migram da solução para a superfície, formando um filme rico em CaO-P₂O₅ amorfo. Por último, incorporação de grupos carbonato e hidroxil da solução e cristalização do filme de CaO-P₂O₅ para HCA (JONES, 2012; HENCH *et al.*, 2000; CLARK, HENCH and PASCHALL, 1976).

Segundo Hench e Paschall, Ph alcalino e atividade de íons cálcio e fósforo na superfície são imprescindíveis para a adesão química com o osso (HENCH and PASCHALL, 1973).

Um estudo mostrou que a zona de transição biovidro-osso pode se formar rapidamente, por volta de 10 dias, quando o implante está estável (HENCH *et al.*, 1977).

A composição do vidro é a variável que mais influencia a formação da camada de HCA e a ligação com o osso. A conectividade da rede é a chave da bioatividade e ela é dependente da composição de sílica e de como outros cátions a modificam. Um menor conteúdo de sílica, por exemplo, significa uma menor conectividade da rede, o que torna a dissolução mais favorável, e a composição mais bioativa. A adição de Na⁺ as expensas do silício, aumenta a taxa de dissolução do vidro, já a adição de outros cátions, como Al⁺³, Ti⁺⁴ ou Ta⁺⁵ reduz a bioatividade pela redução da solubilidade (JONES, 2012).

A bioatividade ocorre somente dentro de certos limites de composição e proporções muito específicas de óxidos no sistema Na₂O–K₂O–CaO–MgO–P₂O₅–SiO₂. Uma camada de HCA biologicamente ativa deve formar para que uma ligação com tecidos possa ocorrer. Essa é a característica comum de todos os materiais de implantes bioativos conhecidos. A taxa de formação de HCA e o tempo para o início da cristalização varia muito. Quando a taxa se torna excessivamente lenta, nenhuma ligação se forma, e o material não é mais bioativo (YAMAMURO, 2016).

Pereira et al. (1995) avaliaram a taxa de formação de HCA relacionada a textura da superfície de gel-sílica, em “simulated body fluid” (SBF). Os resultados mostraram que a velocidade de formação da camada de HCA é dependente do PH e da concentração de íons da solução de SBF, assim como da textura do substrato (volume e tamanho de poros). O aumento de PH 7,25 para 7,4 e da concentração de Ca⁺² no SBF de 2,5 para 5,0 mM reduziram o tempo de formação de HCA de 30 dias para 16 horas. Os pesquisadores relacionaram o conceito do aumento da atividade iônica para suportar a hipótese de que os poros são sítios de nucleação da hidroxiapatita. A concentração iônica dentro dos poros é maior do que em qualquer outra parte da superfície e o grau da supersaturação requerida para a nucleação da HCA é mais provável de ocorrer dentro do poro. A difusão de íons da solução deve ocorrer para que a supersaturação dentro dos poros seja alcançada. Quando o volume e tamanho do poro diminuem, a menor difusão de íons dentro dos poros se torna um

fator limitante e o número de sítios de nucleação diminui. O aumento na temperatura de tratamento do gel de sílica diminui o volume do poro e aumenta o tempo de nucleação de HCA.

Durante anos, via-se a formação da camada reativa de HCA como requisito básico requerido para se ter comportamento bioativo em uma superfície. Porém, estudos recentes mostraram que a formação da camada de HCA é útil, mas não a fase crítica do processo de regeneração óssea. O fenômeno mais importante seria o controle da liberação dos produtos da dissolução iônica, principalmente concentrações críticas de sílica solúvel e íons cálcio, que deveriam estar em concentrações aproximadas de 17-10 ppm para o Si e 88-100 ppm para o Ca. A função do vidro bioativo é, primariamente, a liberação de concentrações críticas de íons biologicamente ativos, nos níveis requeridos para a proliferação e diferenciação celular (XYNOS *et al.*, 2000b; HENCH, 2006; HENCH *et al.* 2000). Os íons agem como co-fatores de enzimas, ativando sua função catalística e influenciando, portanto, as vias de sinalização celular que coordenam as atividades e funções das células (HOPPE, GÜLDAL, AND BOCCACCINI 2011).

Os materiais bioativos devem apresentar sincronismo entre a cinética de solubilização dos componentes do vidro bioativo e a sequência das cascatas de reações celulares que ocorrem no processo de reparo ósseo. A velocidade de dissolução e liberação iônica não pode ser nem tão alta a ponto de não ser efetiva, nem tão baixa a ponto de não estimular a diferenciação e proliferação celular (HENCH, 2006)

O controle das dosagens de dissolução iônica é importante pois o excesso de íons pode ser tóxico para as células. A expressão dos genes é dose dependente, com a mais alta expressão de gene observada na concentração de $20\mu\text{g ml}^{-1}$ de sílica solúvel e de $60-90\mu\text{g ml}^{-1}$ de íons cálcio. Percebe-se o aumento na produção de IGF II e glutamato pelos osteoblastos na presença de íons cálcio extracelular e maior produção de colágeno tipo I na presença de sílica (HENCH, 2009; MAENO *et al.*, 2005).

Um estudo revisou a atividade de diversos íons que ao serem incorporados a rede molecular de vidro bioativos à base de silicatos interferem no comportamento celular e na formação da camada acelular de HCA. Para vidros bioativos dopados com Zn, os resultados de um conjunto de artigos não deram consistência à hipótese de que o Zn é capaz de aumentar a formação da camada acelular de HCA na superfície

do vidro bioativo. O mesmo se viu para os efeitos biológicos. Apesar de alguns artigos relatarem o aumento na proliferação de osteoblastos e estímulo da atividade de fosfatase alcalina, não foram apresentados resultados sedimentados e com clareza suficiente para confirmar o efeito osteogênico da liberação de Zn. Outros estudos com vidros à base de silicatos dopados com estrôncio exibiram aumento da bioatividade celular, além de aumento na proliferação e diferenciação de osteoblastos e maior atividade de ALP. Também demonstraram alta biocompatibilidade pela forte ligação da camada HCA com o tecido ósseo. Pesquisas com vidros bioativos dopados com magnésio (Mg) tem mostrado um significativo efeito na proliferação e diferenciação de osteoblastos, no aumento da expressão de colágeno tipo I, ALP, RUNX2 e osteocalcina. Porém, resultados não confirmam se a maior atividade osteogênica está associada ao estímulo específico do Mg ou ao fato de que o Mg leva ao rompimento da rede de sílica, aumenta a dissolução do vidro bioativo, provocando maiores níveis de Si e Ca livres no meio. Estudos de vidros dopados com boro exibiram a concentração de 0,65mmol como sendo o valor limítrofe para o estímulo celular. Valor abaixo do limite resultaram em aumento da proliferação de células ósseas e boa biocompatibilidade, valores acima do limite, exibiram uma redução no crescimento e proliferação de células ósseas medulares. Outros estudos confirmaram as propriedades antibacterianas do íon Ag^+ , sendo que sua incorporação em vidros bioativos é altamente promissora para ser aplicado como anti-inflamatório em tecidos de cicatrização (HOPPE, GÜLDAL and BOCCACCINI, 2011).

Estudos mostram que os ciclos das células osteoblásticas podem ser alterados por estímulos genéticos. Várias famílias de genes, especialmente os que codificam fatores de crescimento IGF II, o mais abundante fator de crescimento do osso, são estimuladas na presença de extratos químicos solúveis de biovidros. Portanto, é importante observar que o resultado final do ciclo celular ativado por produtos iônicos de dissolução de vidro bioativo é a supra-regulação de numerosos genes que expressam fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular (HENCH, 2006).

Estudos que avaliaram a toxicidade e biocompatibilidade de vidros bioativos concluíram que esses podem ser considerados citocompatíveis por não possuírem efeitos significativamente negativos, substâncias lixiviáveis que produzem processo inflamatório e por não impedirem crescimento e divisões em cultura celular (WILSON *et al.*, 1981; FOPPIANO *et al.*, 2004).

O processo de regeneração óssea associado a materiais bioativos Classe A envolve rápidos eventos celulares que se definem em 24 horas. Na fase inicial G_0 , após estímulo químico local, a célula sai de sua latência para a fase G_1 onde ocorre o seu crescimento e normal metabolismo. Nessa fase os osteoblastos sintetizam a enzima fosfatase alcalina, que pode ser usada como marcador do processo de diferenciação, e tropocolágeno, que se unem para formar o colágeno tipo I. Se o ambiente químico é favorável, a célula passa da fase de crescimento G_1 para a fase de síntese e duplicação de DNA, fase S. Entrando na próxima fase, G_2 , a célula está pronta para sofrer mitose após uma segunda fase de crescimento. Na transição da fase G_2 para fase M (mitótica), é necessário um aumento de massa, além de síntese e ativação de fatores de crescimento. Se o ambiente químico não é propício para conclusão das fases G_1 ou G_2 , a célula entra em apoptose (HENCH, 2000; HENCH *et al.*, 2000).

Ao se comparar a cultura de osteoblastos em substratos bioativo e bioinerte observou-se um aumento de 100% no crescimento das células em substrato bioativo durante as fases S e G_2 -M do ciclo celular no segundo dia de cultura. A maior mudança populacional ocorreu para células em apoptose. No segundo dia, o meio bioativo apresentou cinco vezes mais osteoblastos em apoptose. Alterações das populações de células acontecem em todos os estágios dos ciclos celulares. Nos substratos bioinertes, os osteoblastos se fixam rapidamente e entram na fase M do ciclo celular com sequente confluência celular, com poucas apoptoses. Já no substrato bioativo, o crescimento de osteoblastos é lento e muitas células entram em apoptose. Entretanto, no segundo dia, a maioria dos osteoblastos estavam mitoticamente ativos, duas vezes mais células estão na fase S e G_2 -M em comparação ao substrato bioinerte. Nesse estágio, a atividade de fosfatase alcalina é equivalente para ambos substratos. A importância do substrato bioativo no controle do ciclo de osteoblastos se torna aparente a partir do sexto dia de cultura. A proporção de osteoblastos na fase S e G_2 -M é maior para células em substrato bioativo e a maioria das células em crescimento estão expressando fosfatase alcalina. E o mais importante é que a produção de osteocalcina é maior nos osteoblastos que crescem em contato com vidro bioativo. Osteocalcina é uma proteína não colágena da matrix óssea extracelular produzida por osteoblastos maduros e sua produção está correlacionada a fase inicial de mineralização. Análise em microscópio eletrônico de varredura realizada no sexto dia de crescimento de osteoblastos em substrato bioativo

mostra estruturas tridimensionais organizadas, compostas de células e matriz extracelular mineralizada com complexidade organizacional semelhante ao osso natural. Em contraste, o crescimento de osteoblastos em substratos bioinertes, não mostrou evidências de formação de nódulos ósseos. No décimo segundo dia, a síntese de fosfatase alcalina diminuiu consideravelmente em culturas de osteoblastos em substratos bioativos. Isso porque a produção de fosfatase está associada a fase imatura do fenótipo celular. Já a produção de osteocalcina continua em alta (XYNOS *et al.*, 2000b).

Um estudo que avaliou a expressão genética de osteoblastos por método de análise microarray concluiu que os produtos da dissolução iônica de vidros bioativos têm um efeito direto sobre a expressão gênica de osteoblastos humanos. Os resultados mostraram que uma solução contendo íons Ca, P e Si pode estimular a transcrição de genes em osteoblastos, embora não tenha sido possível determinar quais elementos foram responsáveis por mudanças observadas na transcrição de genes (XYNOS *et al.*, 2001).

Um estudo analisou os efeitos dos produtos da dissolução iônica do vidro bioativo com 60% de sílica (BG60S) no comportamento de cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos. A análise de MTT por 72 horas, trouxe como resultado, um aumento da viabilidade celular em todos os tipos de células. A proliferação de cementoblastos foi 107% maior do que o grupo controle, as outras células obtiveram 104% (CARVALHO *et al.*, 2009).

Uma das características mais marcantes do programa de desdobramento transcricional de osteoblastos humanos após tratamento com os produtos iônicos da dissolução de vidro bioativo foi a indução de genes com papéis conhecidos em processos relevantes para o metabolismo de osteoblastos e homeostase óssea. Estes incluíam genes que codificam produtos que podem induzir a proliferação de osteoblastos (por exemplo, RCL), participar nos processos dinâmicos do remodelamento da matriz extracelular (por exemplo, metaloproteinases), executar funções diferenciadas (por exemplo, CD44) e promover ligação célula-célula e matriz-célula (por exemplo, integrina $\beta 1$) (XYNOS *et al.*, 2001).

Uma técnica de esmaltagem foi utilizada para produzir uma dupla camada de vidro bioativo sobre a superfície de liga de titânio (Ti6Al4V) buscando obter confiabilidade de aderência e bioatividade. Das camadas, a primeira com 61% em peso de Si com pequenas quantidades de óxido de K e Mg, para proporcionar um

coeficiente de expansão térmica compatível com a liga de titânio, e a segunda 55% em peso de Si. O estudo teve como objetivos: avaliar a biocompatibilidade, *in vitro*, de revestimentos bioativos e testar a expressão de genes envolvidos nas fases iniciais de osteogênese. As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho (FTIR) e difração de Raio X (DRX) mostraram formação da camada cristalina de HCA na superfície de vidro bioativo, o mesmo não ocorrendo sobre Ti6Al4V e controle (base do poço de cultura). Utilizando RT-PCR concluiu-se que o biovidro induziu duas vezes mais a expressão de Runx-2, fator de transcrição necessário para diferenciação de células progenitoras mesenquimais em linhagem osteoblástica, do que Ti6Al4V e controle. A expressão de Colágeno tipo 1 pelo biovidro e Ti6Al4V foi cerca de 80% da expressão induzida pelo grupo controle. Os níveis de mineralização foram maiores para o biovidro do que para o Ti6Al4V, porém menores que o grupo controle (FOPPIANO *et al.*, 2007).

Um estudo avaliou os efeitos de produtos iônicos de vidro bioativo BG60S na atividade de células osteogênicas de cães. Osteoblastos foram adicionados em quatro diferentes meios: meio basal (DMEM), meio basal com produtos iônicos (DMEM IP), meio osteogênico (OST) e osteogênico com produtos iônicos (OST IP). Os resultados mostraram um aumento da atividade de fosfatase alcalina no grupo (DMEM IP) em relação ao grupo controle (DMEM) nos dias 7 e 14 e uma redução na atividade de fosfatase alcalina para o grupo (OST IP) quando comparado ao grupo controle (OST) nos dias 14 e 21. Os grupos que receberam produtos iônicos tiveram um aumento significativo na porcentagem de área mineralizada e um avanço na maturação da matriz extracelular em relação aos grupos que não receberam produtos iônicos. Além disso, os grupos que receberam produtos iônicos tiveram um aumento significativo na expressão de sialoproteína óssea (BSP), osterix (OSX), osteonectina (ON) e osteocalcina (OC) quando comparado aos grupos controles sem produtos iônicos. A fosfatase alcalina é uma enzima presente na membrana dos osteoblastos e participa diretamente da síntese e mineralização da matriz óssea. É utilizada como parâmetro para avaliação da atividade osteoblástica. O aumento da expressão das proteínas osteocalcina, osteonectina, sialoproteína óssea e osterix em culturas que receberam produtos iônicos sugere que a dissolução iônica de BG60S estimula o aumento na produção e mineralização da matriz óssea. Os efeitos dos produtos iônicos da dissolução de BG60S na atividade osteoblástica são, provavelmente, por causa da liberação dos íons Ca e Si (ALVES *et al.*, 2015).

O aumento do nível de Ca extracelular induz a proliferação e quimiotaxia de osteoblastos, por meio da ligação de cálcio a receptores extracelulares denominados “proteína G”. Já, o transporte de P pelos osteoblastos desencadeia o mecanismo de síntese de osteopontina e consequente regulação da mineralização (BECK, ZERLER AND MORAN, 2000). Embora o receptor celular para Si ainda não ter sido identificado, existem evidências sugerindo sua função no metabolismo ósseo. Soluções concentradas de Si induzem a proliferação e expressão de RNA-m TGF- β em osteoblastos (XYNOS *et al.*, 2001).

Osteopontina é uma glicoproteína fosforilada secretada por osteoblastos para a mineralização da matriz extracelular. Um cenário sugerido pelos resultados de um estudo é de que a osteopontina é induzida em tecidos onde a atividade enzimática de fosfatase alcalina no meio resulta na geração de fosfato livre em níveis acima da normalidade, sendo suficiente para induzir RNA osteopontina. A relação existente entre os níveis de expressão de osteopontina e os níveis de fosfato, combinada com a habilidade de regulação de cálcio pela osteopontina, sugere que a função de transporte de cálcio atribuída a osteopontina acontece em condições de elevados níveis celulares de fosfato (BECK, ZERLER and MORAN, 2000).

TGF- β é sintetizado por osteoblastos e é um potente regulador das funções osteoblásticas. Um estudo relatou um aumento na proliferação de células osteoblásticas humanas e da atividade de fosfatase alcalina em presença de TGF- β e Zeolito A. Entretanto, TGF- β diminuiu a liberação de osteocalcina enquanto o Zeolito aumentou a sua liberação, sob estímulo de 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ (KEETING *et al.*, 1992).

Os estudos de Valério *et al.* (2004) avaliaram a viabilidade, proliferação e atividade metabólica de osteoblastos cultivados em contato com produtos iônicos de vidro bioativo com 60% de sílica (BG60S) e fosfato de cálcio bifásico (BCP), separados em diferentes grupos. Observou-se que a atividade mitótica foi 35% maior no grupo BG60S ao se comparar com os grupos (fosfato de cálcio bifásico) BCP e controle. A morfologia das células demonstrou um grande número de vacúolos citoplasmáticos na presença de BG60S, o que não foi observado no grupo BCP. Investigando o conteúdo dos vacúolos, observou-se que seu interior tinha 75% mais Si do que outras regiões celulares externas ao vacúolo. O grupo BG60S teve uma produção de colágeno 25% maior do que os outros grupos. Os resultados mostraram correlação entre a alta produção de colágeno e a vacuolização e interiorização de silício. Não

houve diferença estatisticamente significativa para a produção de fosfatase alcalina pelos osteoblastos, quando os grupos foram comparados.

A biocompatibilidade de implantes de titânio cobertos com HA e vidro bioativo (BG) (SiO_2 65%, CaO 31%, P_2O_5 4%) via sol-gel foi investigada usando modelos *in vitro* e *in vivo*. A expressão fenotípica de osteoblastos na produção de fosfatase alcalina, osteocalcina e colágeno foi avaliada *in vitro*. Os resultados evidenciaram aumento significativo da atividade de fosfatase alcalina em superfícies cobertas com HA e BG em comparação com o grupo controle (titânio sem cobertura). A síntese de colágeno foi maior em superfície de HA em comparação a de BG e controle. Já a produção de osteocalcina foi maior na superfície de BG em comparação à HA e controle. Ensaio *in vivo* avaliaram força de contra-torque e contato osso-implante (BIC). Após 4,5 semanas, os valores de BIC foram ligeiramente maiores para o grupo BG em relação ao HA, enquanto que o grupo controle atingiu o menor valor. Os valores de contra torque após 12 semanas foram significativamente maiores para os implantes com cobertura de HA em comparação aos de BG. Após 12 semanas, o valor de BIC se mostrou significativamente maior na superfície coberta com HA em relação ao controle, não havendo diferença estatística em relação ao grupo BG. Os grupos HA e BG mostraram melhores resultados tanto *in vitro* quanto *in vivo* em relação ao grupo controle sem cobertura (RAMIRES *et al.*, 2003).

Um estudo avaliou a utilização de coberturas híbridas (TEOS-MTES) sol-gel para melhoria da performance de implantes de aço inoxidável. Concluíram que a cobertura foi capaz de inibir o processo de corrosão atuando como uma barreira à migração de íons metálicos. Os resultados indicaram que a quantidade de nanopartículas de sílica desempenham um papel no aumento da bioatividade do revestimento. Uma menor quantidade de sílica (10%) na camada interna obteve resultados um pouco melhor do que a cobertura com maior quantidade (30%). As nanopartículas de sílica adicionadas a revestimentos híbridos diminuem a porosidade da superfície e com isso, os locais de nucleação para a apatita são bloqueados. Os estudos *in vivo* sugerem que a melhor qualidade do osso neoformado está associada a menor quantidade de nanopartículas de sílica (BALLARRE *et al.*, 2010).

Um estudo avaliou a habilidade de nanopartículas de vidro bioativo introduzido em poros de superfícies de titânio estimularem a formação óssea em regiões profundas dos poros. Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura, análise histológica e EDS mostraram que a superfície tratada com

nanopartículas de vidro bioativo teve crescimento ósseo dentro dos poros, enquanto que a superfície de titânio sem tratamento resultou crescimento ósseo somente na região mais externa dos poros. A análise de EDS detectou presença de Ca e P em regiões mais profundas, sugerindo que em dez semanas todo o vidro bioativo havia sido trocado por nova formação óssea dentro dos poros. Após dez semanas a porcentagem de poros ocupados por osso em superfície preenchida com vidro bioativo alcançou 38%, contra 22% em poros sem biovidro (DRNOVŠEK *et al.*, 2012).

Sabe-se que, por depender quase que exclusivamente de retenção mecânica, a fraca adesão do vidro bioativo à superfície de titânio pode causar delaminação ou fratura da cobertura, gerando uma desfavorável resposta *in vivo*. A ausência de ligação química entre o TiO_2 da superfície do implante e o SiO_2 do vidro bioativo tem como consequência uma força de adesão limitada. Pensando nisso, pesquisadores avaliaram composições à base de deposição conjunta de hidroxiapatita e vidro bioativo, afim de melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas das coberturas. Para tal, dezesseis cães da raça beagle receberam três tipos de implantes com diferentes tratamentos de superfície: titânio coberto com HA, titânio coberto com composição de HA e vidro bioativo com alta proporção (HABGH) e titânio coberto com composição de HA e vidro bioativo com baixa proporção (HABGL). Contato osso-implante e área óssea foram avaliados após 4 e 12 semanas por meio de análises histológica e histomorfométrica. Após 4 semanas, o contato osso implante para as coberturas HA e HABGL foi significativamente maior quando comparado à cobertura HABGH. Valores médios para a porcentagem de área óssea mostraram-se semelhantes para as coberturas HABGH (56,3%) e HABGL (58,3%), enquanto que a cobertura de HA resultou em uma área óssea (68,3%) significativamente maior em relação a cobertura HABGH. Após 12 semanas todos os 3 grupos apresentaram similar contato osso-implante e sem diferença em relação a área óssea. Os autores concluíram que a incorporação de vidro bioativo à HA em cobertura de implante de titânio não aumenta a performance biológica da superfície de implante. Ao contrário, superfície contendo alta concentração de vidro bioativo resultou em piores resultados em período de pós implantação (VAN OIRSCHOT *et al.*, 2014).

Rotas de síntese

Os primeiros vidros bioativos e vidros cerâmicos envolviam processos de fundição do vidro em altas temperaturas. Em 1991, Hench *et al.* (1991) demonstraram que o vidro bioativo poderia ser produzido pela técnica sol-gel. Essa descoberta proporcionou um novo método de processamento para personalização a nível molecular e de texturas (HENCH, 2006; LI, 1991). As principais motivações para o processo sol-gel são o aumento da pureza e homogeneidade e diminuição na temperatura de processamento, comparado ao método tradicional para fundição de vidro ou cerâmica (HOPPE, GÜLDAL and BOCCACCINI, 2011).

Existem duas rotas de processamento para síntese do vidro: a fundição tradicional e o processo sol-gel. O biovidro 45S5 e outros vidros bioativos são produzidos pela fusão de óxidos em temperaturas superiores a 1300°C. O processo sol-gel desenvolve-se por uma rota de síntese baseada na química a temperatura ambiente onde nanopartículas de sílica são formadas e unidas em reações tipo poliméricas para formar o gel. O gel é formado por uma rede inorgânica de ligações covalentes de sílica, que é aquecida a temperatura de 600°C para então se tornar um vidro. As diferenças físicas dos dois métodos de processamento de vidro estão associadas a maior nanoporosidade do vidro produzido pela rota sol-gel, uma vez que a rota de fusão produz vidros densos. A nanoporosidade pode resultar em uma melhor resposta celular por causa da nano topografia e da área de superfície, que é duas vezes maior do que composições similares sintetizadas pela rota de fusão (JONES, 2012).

Um estudo avaliou a relação do pH e da temperatura na formação da rede de sílica em vidros bioativos 70S30C derivados do processo sol-gel e a possibilidade de incorporar o cálcio em baixas temperaturas. Esse estudo se fez valer da necessidade de relacionar as variações de pH e temperatura com o fator bioatividade. O vidro bioativo híbrido inorgânico/orgânico tem um grande potencial como material de implante. A incorporação de um polímero na estrutura do vidro melhora as propriedades mecânicas do material. Porém, na formação de vidro híbridos, a incorporação de polímeros em processo sol-gel, faz-se necessário que seja em baixas temperaturas e pH mais ameno para que não haja degradação do polímero pela cisão da cadeia. O método utilizou secagem de Gel a temperatura de 40°C comparado com a estabilização a 600°C e variou valores de pH (pH 0,5 a 5,5). Os resultados

mostraram que o aumento de pH na síntese do vidro a 600°C e a 40° C com pH >2 gerou poros maiores. Todos os géis secos a 40°C tiveram maior liberação de íons por imersão em SBF do que vidros estabilizados a 600°C. O Cálcio só foi incorporado na rede de sílica estabilizada em 600°C, já o biovidro seco a 40°C não foi capaz de incorporar Ca em sua rede (VALLIANT *et al.*, 2012).

Materiais derivados do sol-gel podem ser produzidos por duas vias alternativas; gelificação de suspensão coloidal ou hidrólise e condensação de precursor químico alcóxido. O sistema coloidal resulta em estruturas de escalas sub micrométricas, enquanto o sistema alcóxido exhibe estruturas em escalas nanométricas (VALLIANT *et al.*, 2012).

Ainda não se descobriu uma composição de vidro bioativo com melhores propriedades biológicas que a original composição do “bioglass 45S5”. Vidros bioativos se ligam mais rapidamente com o osso que outras cerâmicas bioativas porém, comercialmente, apresentam um menor sucesso. Algumas razões são comerciais, mas há também limitações para se produzir fibras, arcabouços porosos de suporte e coberturas, pelo fato de cristalizarem durante a sinterização. Algumas soluções foram encontradas para resolver os problemas da sinterização, como a síntese de vidro via sol-gel que produz a rede de sílica à temperatura ambiente (JONES, 2015). Vidros bioativos produzidos pela rota sol-gel, geralmente, apresentam menos componentes que na rota de fusão. Isso porque a função primária do Na₂O na síntese do vidro por fusão é de diminuir o ponto de fusão, melhorando a processabilidade. Esse também aumenta a solubilidade do vidro, o que é importante para a bioatividade. A grande área de superfície de vidros sintetizados pela rota sol-gel resulta em maior velocidade de dissolução, e como não há processo de fusão envolvido, o sódio não entra na composição (JONES, 2012).

Valores diferentes de pH, determinados para o processo de síntese do vidro bioativo via sol-gel, resultam em biovidros com características físicas diferentes. Em uma reação de hidrólise básica, o silicato precursor, Tetraetil Ortosilicato (TEOS), forma nano partículas bioativas esféricas e partículas submicrométricas. Sob catálise ácida, monolíticos e micropartículas são produzidos (JONES, 2012).

Os vidros bioativos obtidos por via sol-gel apresentam uma desvantagem em relação aos vidros produzidos pelo processo de fusão. A grande contração que ocorre durante a secagem e a evaporação do líquido de subprodutos da reação de condensação produz rachaduras nas peças monolíticas produzidas pela técnica sol-

gel. Nos materiais de revestimento, fibra ou em pó, as tensões geradas são menores e dissipadas mais facilmente, não havendo formação de rachaduras (JONES, 2012; HOPPE, GÜLLDAL, and BOCCACCINI, 2011)

Pesquisadores estudaram o comportamento do crescimento de trincas motivadas por tensão e corrosão de vidros bioativos sinterizados a 1400°C utilizados em revestimentos de implantes de ligas de Ti ou Co-Cr. As amostras foram testadas em SBF. O ataque aquoso da rede de Si-O do vidro parece ser o mecanismo dominante no crescimento da trinca nestes vidros bioativos. O aumento das trincas foram controladas pela reatividade química, onde os resultados sugerem que o aumento da bioatividade nas regiões de fissuras, gerou o crescimento dessas (BLOYER *et al.*, 2007).

Um dos maiores desafios do vidro bioativo utilizado na cobertura de implantes é coincidir seu coeficiente de expansão térmica ao do metal titânio, para que não haja o descolamento do vidro aderido à superfície. Para isso, algumas composições de vidro tem sido testadas, como a substituição de parte de Na₂O e CaO por K₂O e MgO, respectivamente, como uma das vias para adequar os coeficientes de expansão térmica dos materiais. Porém, a gama de composições de biovidros que forma bons revestimentos e tem atividade bioativa é restrita (GOMEZ-VEGA *et al.*, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver novas superfícies de titânio revestidas com materiais bioativos, caracterizando-as físico-quimicamente e avaliando biologicamente *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir uma superfície rugosa de titânio pelo método de jateamento de óxido de alumínio (malha 250) e duplo ataque ácido (HF/HNO₃) utilizada como grupo controle e como substrato para aplicação de revestimentos.

- Sintetizar um revestimento à base de vidro bioativo utilizando a rota sol-gel em baixa temperatura, via hidrólise e condensação de precursor químico alcóxido (TEOS).

- Sintetizar um revestimento à base de vidro bioativo utilizando a rota sol-gel em baixa temperatura, via gelificação de suspensão coloidal.

- Aplicar os materiais à base de vidro bioativo sobre a superfície de titânio utilizando tecnologia de imersão controlada (dip-coating).

- Agregar o composto químico hidróxido de potássio (KOH) em superfícies previamente produzidas.

- Caracterizar as superfícies produzidas.

- Avaliar o comportamento físico e químico das superfícies.

- Avaliar o comportamento biológico *in vitro* das superfícies.

4 METODOLOGIA EXPANDIDA

4.1 Delineamento de estudo

Estudo experimental *in vitro* qualitativo e quantitativo, realizado de acordo com um desenho completamente aleatorizado. As variáveis independentes investigadas foram as superfícies de titânio preparadas com jateamento de óxido de alumínio e limpeza ácida; superfícies de titânio preparadas com jateamento de óxido de alumínio e limpeza ácida (HF/HNO₃), com incorporação de precipitados de KOH; superfícies de titânio com cobertura de vidro bioativo sintetizado pela rota sol-gel via hidrólise e condensação de precursor químico alcóxido (TEOS); superfícies de titânio preparadas com jateamento de óxido de alumínio e limpeza ácida (HF/HNO₃), cobertas de vidro bioativo sintetizado pela rota sol-gel via hidrólise e condensação de precursor químico alcóxido (TEOS), com incorporação de precipitados de KOH; e as superfícies de titânio com cobertura de vidro bioativo sintetizado pela rota sol-gel via gelificação de suspensão coloidal (BIOV). Para cada variável independente avaliou-se as seguintes variáveis dependentes: rugosidade superficial, hidrofiliabilidade da superfície, grau de citotoxicidade, multiplicação e crescimento celular e formação de nódulos de calcificação. Avaliações qualitativas também foram realizadas para caracterizações físicas e químicas das variáveis independentes.

4.2 Grupos Experimentais

Grupo I (T) – Superfícies de titânio preparadas com jateamento de óxido de alumínio e limpeza ácida (HF/HNO₃).

Grupo II (T+KOH) – Superfícies de titânio preparadas com jateamento de óxido de alumínio e limpeza ácida (HF/HNO₃), com incorporação de precipitados de KOH.

Grupo III (TEOS) - Superfícies de titânio preparadas com jateamento de óxido de alumínio e limpeza ácida (HF/HNO₃), cobertas de vidro bioativo sintetizado pela rota sol-gel via hidrólise e condensação de precursor químico alcóxido (TEOS).

Grupo IV (TEOS+KOH) – Superfícies de titânio preparadas com jateamento de óxido de alumínio e limpeza ácida (HF/HNO₃), cobertas de vidro

bioativo sintetizado pela rota sol-gel via hidrólise e condensação de precursor químico alcóxido (TEOS), com incorporação de precipitados de KOH.

Grupo V (BIOV) - Superfícies de titânio preparadas com jateamento de óxido de alumínio e limpeza ácida (HF/HNO₃), cobertas de vidro bioativo sintetizado pela rota sol-gel via gelificação de suspensão coloidal.

4.3 Métodos de produção das superfícies

As superfícies foram produzidas no Departamento de Química da UFMG, Laboratório de Materiais e Pilhas a Combustível (LAMPAC).

4.3.1 Preparo do substrato (superfície de Titânio)

Quinhentos discos de titânio grau 4 com dimensões de 4mm de diâmetro por 2mm de altura foram usinados pela empresa PecLab (Belo Horizonte, Minas Gerais Brasil). Em posse das amostras, foi realizado o preparo da superfície plana em uma das faces de cada disco.

Inicialmente, o jateamento com óxido de alumínio malha 250 foi processado em uma câmara sob pressão de 6 Kg/cm² a uma distância de 7cm por um tempo de 30 seg. Em seguida, os discos passaram por um processo de limpeza e descontaminação para remoção de resíduos depositados pelos processos de usinagem e jateamento, seguindo as normas da ASTM B600. A limpeza foi realizada imergindo os discos em solução de ácido nítrico (70%) 10 a 30% vol. (150 a 450 g/L) e ácido fluorídrico (60%) 1 a 3% vol. (12 a 36 g/L) a 49°C (120°F), mantidos a uma razão de 10 partes de ácido nítrico para 1 parte de ácido fluorídrico. Após esse processo, as peças foram lavadas dez vezes com água destilada e acetona para a remoção de resíduos.

Os cinco grupos seguiram o mesmo método de preparo para o substrato de titânio.

4.3.2 Síntese dos vidros bioativos

4.3.2.1 Síntese do vidro bioativo pela rota sol-gel via hidrólise e condensação de precursor químico alcóxido (TEOS)

O sistema (SiO_2) foi sintetizado pela rota sol-gel via hidrólise do tetraetilortosilicato (TEOS), catalisada por ácido, a temperatura entre 24 e 26°C e com umidade relativa inferior a 59%. Para formação do vidro bioativo, foi adicionado a uma solução alcoólica, em pH 1,5, o TEOS, em constante agitação. A razão molar da solução foi de 1:4:1,5-2 (TEOS: ETANOL: Solução de HCl) (DOMINGUES, CLARK, and BRENNAN, 2001).

A solução foi agitada por 30 minutos até o processo de imersão.

Os discos de titânio dos grupos III e IV foram, então, lavados com detergente alcalino e acetona, para retirar todos os resíduos. Após a limpeza, os discos foram recobertos pelo sol-gel, utilizando o método dip-coating. Após o recobrimento, as peças foram deixadas na estufa a vácuo, à 37°C, por 15 dias, para completa formação da rede de vidro bioativo.

A síntese desse vidro bioativo foi realizada seguindo protocolo de patente registrado sob o número PI 0200698-7.

4.3.2.2 Síntese do vidro bioativo pela rota sol-gel via gelificação de suspensão coloidal

Inicialmente, foram misturados 330 mL de álcool etílico 99% PA e 101 mL de água destilada em um béquer de plástico de 2L. Em seguida, foram adicionados 21,2 g de sílica pirogênica (SiO_2) à solução álcool/água e agitados até completa homogeneização. Sequencialmente, 31g de cloreto de cálcio dihidratado PA ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram adicionados à mistura e homogeneizados. Logo em seguida, 1,45mL de ácido fosfórico 85% m/v foi incorporado à mistura e também homogeneizado. O composto foi deixado sob agitação na capela até a formação de gel viscoso. O gel viscoso foi transferido para tubos falcon, os quais foram deixados no dessecador úmido por 24h, e em seguida colocados na estufa à 60°C por 7 dias até completa secagem. O material foi mantido em estufa à 60°C até a utilização.

Inicialmente, 3,0 g de vidro bioativo foram dispersos em uma solução de 20% etanol/água utilizando um ultrassom de ponta, por cinco minutos. Os discos de titânio do grupo V foram, então, lavados com detergente alcalino e acetona, para retirar todos os resíduos. Após a limpeza, os discos foram recobertos pela dispersão, utilizando o método dip-coating. Após o recobrimento, as peças foram deixadas na estufa, à 70°C, por 24 horas, para eliminação dos solventes.

A síntese desse vidro bioativo foi desenvolvida no Departamento de Química da UFMG, Laboratório de Materiais e Pilhas à Combustível (LAMPAC) e está em processo de patente.

4.3.3 Técnica de recobrimento da superfície de titânio por vidros bioativos

Dois diferentes materiais químicos da família de vidros bioativos foram sintetizados para serem utilizados no recobrimento do substrato de titânio. Independentemente do material químico utilizado na cobertura da superfície dos diferentes grupos, a técnica utilizada para a deposição do revestimento foi sempre a mesma. Os discos dos grupos III, IV e V receberam recobrimento de vidro bioativo por imersão controlada pela técnica dip-coating. Para o controle da imersão, foi utilizado um equipamento desenvolvido pelo departamento de engenharia de materiais e construção (DEMC) da escola de engenharia da UFMG. A fim de obter um filme de espessura homogênea da amostra, manteve-se constante o ângulo entre a peça e o sol (90°C), além de uma velocidade de entrada e saída de imersão programada a 1,05 ($\pm 0,02$) cm.min⁻¹. Após o processo de imersão, as peças foram expostas ao ar por cerca de 30 minutos, à temperatura ambiente.

A espessura do filme de vidro formada sobre o substrato se relaciona diretamente a velocidade de emersão. Quanto mais lento o substrato for removido da solução, mais fino será o filme de vidro formado e maior será a probabilidade de se manter a morfologia original do substrato.

4.3.4. Deposição do composto químico hidróxido de potássio (KOH)

A agregação do composto químico hidróxido de potássio sobre a superfície das amostras dos grupos II e IV foi feita imergindo os discos em solução aquosa de hidróxido de potássio a 0,1 mol/L solubilizado em agitação constante. A emersão das

amostras foi realizada na técnica de dip-coating, com uma velocidade de entrada e saída de imersão programada a $1,05 (\pm 0,02) \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$. Após o processo de imersão, as peças foram expostas ao ar por cerca de 30 minutos, à temperatura ambiente.

4.4 Técnicas de caracterização

4.4.1 Avaliação da rugosidade de superfície (Perfilômetro Óptico 3D)

A rugosidade superficial média dos grupos amostrais foi quantificada, em triplicata, utilizando parâmetros de rugosidade aritmética (S_a) e rugosidade quadrática média (RMS). Para tal, utilizou-se um perfilômetro óptico 3D (Zygo New View 7300, Harpenden, UK) com resolução de 100 nm (em Z) sobre área de 2 mm. Uma área de alcance horizontal de $1000 \mu\text{m}$ e vertical de $150 \mu\text{m}$ foi mensurada utilizando a objetiva Nikon 5X.

Valores numéricos para diferentes rugosidades e imagens visuais foram produzidos pelo software de metrologia Zygo MetroPro™, o qual fornece um controle integrado de instrumentos e avançada análise e visualização de dados 3D e 2D, rodando sobre o Microsoft Windows XP.

A análise de perfilometria foi realizada na sala limpa do departamento de física da UFMG.

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Este estudo utilizou-se da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em uma tensão de aceleração igual a 5KV para a caracterização microestrutural de superfície e morfologia das células osteoblásticas.

Para análises de MEV, as amostras foram colocadas em *stubs* de alumínio, fixadas com fita dupla face de carbono. Foram feitas imagens por elétrons secundários e análises por EDS.

As amostras foram analisadas em triplicata no microscópio eletrônico de varredura FEG - Quanta 3D FEG (FEI, Hillsboro, Oregon, EUA) equipado com feixe focalizados de íons, e com detector de raios-X por dispersão em energia (EDS; Bruker), disponibilizado pelo centro de microscopia da UFMG.

4.4.3 Espectrômetro de Raio X por dispersão de energia (EDS)

Nesse estudo, a composição química das superfícies de cada grupo foi analisada, em triplicata, por meio do espectrômetro de raio X por dispersão de energia (EDS), disponível no centro de microscopia da UFMG.

4.4.4 Microscópio Eletrônico de Varredura FEG com Sistema de Nanofabricação FIB - Quanta FEG 3D FEI

Para o presente estudo, o FIB foi utilizado no preparo de amostras (lamelas) para serem analisadas pelo microscópio eletrônico de transmissão (MET).

Para preparação das lamelas, inicialmente foi feita deposição de platina com feixe de elétrons sobre a superfície da amostra, numa área aproximada de $2 \times 10 \text{ } \mu\text{m}^2$ (FIGURA 1.a), e em seguida deposição de uma camada mais espessa de platina com feixe de íons de gálio. Posteriormente, utilizou-se feixe de gálio, acelerado a 5 kV, para erodir a amostra ao redor da área onde foi feita deposição de platina para produção da lamela (FIGURA 1.b). A lamela, de dimensões iniciais $2 \times 10 \times 10 \text{ } \mu\text{m}^3$, foi retirada com auxílio de um micro manipulador (Omniprobe) (FIGURA 1.c) e soldada com platina no suporte de amostras para MET (FIGURA 1.d), e teve sua espessura reduzida entre 50 nm e 100 nm, utilizando-se feixe de íons gálio acelerados a 2 kV.

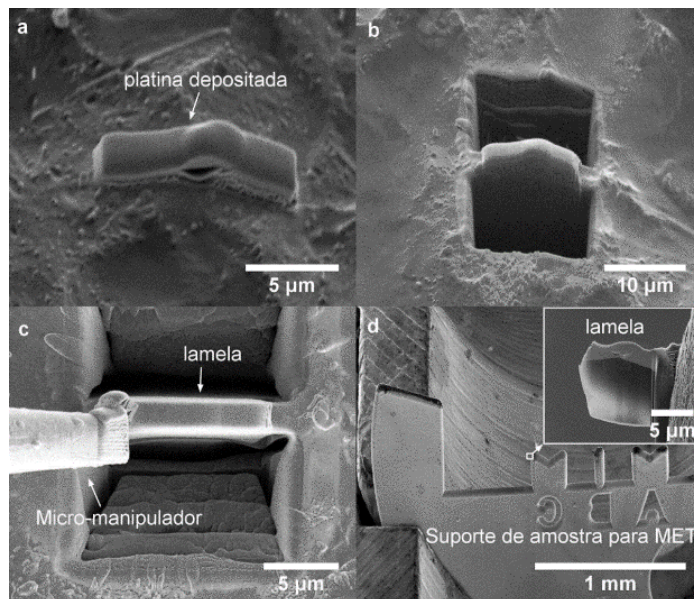


Figura 1 - (a,b,c,d) : Etapas de produção de lamelas das amostras utilizando-se feixe focalizado de íons.

As lamelas foram produzidas no centro de microscopia da UFMG pelo microscópio eletrônico de varredura FEG com sistema de nanofabricação FIB - Quanta FEG 3D FEI (FEI, Hillsboro, Oregon, EUA).

4.4.5 Microscópio eletrônico de Transmissão (MET)

Diferentemente da técnica SEM, a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) requer uma preparação mais cuidadosa e trabalhosa das amostras. Somente amostras finas o suficiente para permitir a transmissão de parte significativa do feixe eletrônico podem ser estudadas. Comumente, um MEV equipado com um FIB pode ser usado para preparar finas lâminas de uma amostra para levar ao MET, esse processo é chamado de lift-out.

Nesse estudo utilizou-se do Microscópio Eletrônico de Transmissão de canhão termiônico (LaB₆) Tecnai G2-20 SuperTwin (FEI) -200 KV, equipado com detector de EDS (EDAX), e com detector de perda de energia de elétrons (EEL ; Gatan Image Filter), do centro de microscopia da UFMG, para mensurar, através das secções transversais das lamelas produzidas pelo FIB, a espessura da camada de vidro bioativo aplicada sobre o substrato de titânio. Utilizou-se também dos detectores EDS e EEL para análise de composição química.

4.4.6 Espectroscopia de Fotoelétrons excitado por Raio X (XPS)

Nesse estudo, analisou-se, a composição química e possíveis ligações atômicas presentes na estrutura química das superfícies.

As análises de XPS foram realizadas no laboratório de física de superfícies do departamento de física da UFMG.

4.4.7 Hidrofilicidade da superfície

Medida de hidrofilicidade da superfície, expressa pelo ângulo de contato, deve ser vista como uma predição de citocompatibilidade (ALFARSI, HAMLET and IVANOVISK, 2014). A adesão celular e sua difusão no biomaterial são dependentes,

entre outros fatores, da molhabilidade da superfície (KOOTEN *et al.*, 1992; KOPF *et al.*, 2015).

Nesse estudo, a molhabilidade relativa da superfície foi avaliada por meio de análise do ângulo de contato obtido pelo método de gota séssil com o instrumento científico GBX. Uma gota de 13 μ l de água destilada foi instilada sobre a superfície de uma amostra tratada. Com uma câmera acoplada a um microscópio óptico, foram realizadas fotografias em três momentos distintos, 1 segundo, 120 segundos e 180 segundos, para que, através das imagens obtidas, fossem mensurados os ângulos de contato. Um sistema de avaliação de imagens calculou o ângulo de contato formado entre a gota e a superfície da amostra (FIGURA 2). O valor utilizado para comparar as diferentes amostras foi extraído da média entre os ângulo esquerdo e direito de cada gota. Sendo que os tempos (1 segundo, 120 segundos e 180 segundos) foram comparados entre as amostras de cada grupo (PONSONNET *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 2001). O teste de hidrofiliicidade foi realizado no Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais do Departamento de Química da UFMG.

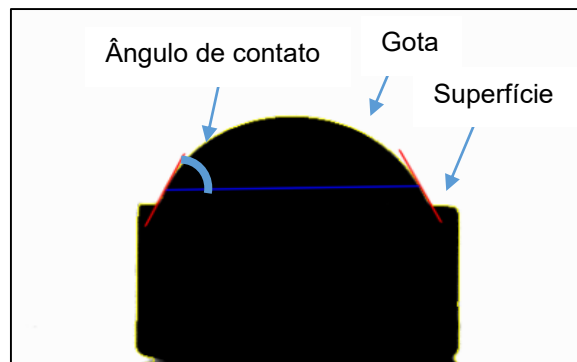


Figura 2 - Representação fotográfica da formação do ângulo de contato formado entre a gota de água destilada e a superfície do disco.

4.5 Estudo experimental *in vitro*

Marcadores bioquímicos foram utilizados para sinalizar respostas de células osteoblásticas perante estímulos físicos e químicos advindos das superfícies em contato. Foram realizados ensaios *in vitro* com o propósito de avaliar a citotoxicidade, grau de mineralização da matriz óssea, colonização e morfologia de células osteoblásticas. Os ensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura

Celular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.5.1 Cultura de células

Os ensaios de cultura celular foram realizados em microplacas de 96 poços. Previamente aos ensaios, as microplacas de cultura receberam três discos amostrais de cada grupo. Durante todo o experimento, foi tomado o cuidado de se manter a face tratada dos discos sempre posicionada para cima. As placas contendo os discos foram embaladas separadamente em envelopes apropriados e esterilizadas com uma dose de 15 quilogray (KGy) de radiação gama no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

Diretamente sobre os discos ou sobre os poços controle foram plaqueadas células pré-osteoblásticas imortalizadas, de calvária de camundongos neonatos (MC3T3-E1, subclone14).

4.5.2 Recuperação e expansão das células

Um vial com 1×10^6 células MC3T3 com passagem 4 que apresentava-se congelado no freezer a -80°C foi descongelado em banho maria a 37°C . Sob o fluxo, o conteúdo do vial foi transferido para uma garrafa de cultura T75 (Corning Inc., Corning, NY, EUA) já contendo 12 mL do meio completo.

Para um volume final de 250mL de solução de meio completo, as proporções foram de 210mL α MEM com glutamina (Gibco, Grand Island, NY, EUA), 2,5mL Penicilina/Streptomicina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) (1%), 37,5mL de soro fetal bovino (15%) (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, EUA).

A troca do meio completo foi realizada após 8 horas. A partir daí, trocou-se o meio a cada 2 dias. Esperou-se, então uma confluência acima de 80% para a utilização das células.

Sob o fluxo, o meio de cultura foi removido e descartado. Em seguida, adicionou-se 3mL de trypsin/EDTA (Gibco, Grand Island, NY, EUA) no frasco, mantendo-o incubado por 3 a 5 minutos na estufa de CO_2 5% à 37°C . Após esse período, foi adicionado 9 mL de meio completo no frasco e transferido todo o conteúdo

para dois tubos Falcon de 15 mL. Os conteúdos foram centrifugados a 24°C por 5 minutos em 1200rpm. O pellet foi, então, ressuspenso em 2mL de meio completo.

4.5.3 Plaqueamento das células

Após a contagem das células na câmara do hemocitômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA), foi realizado o plaqueamento de 5×10^3 células por poço (10 μ L por poço) tendo o volume de cada um, sendo completado para 100 μ L, com meio osteogênico. Em cada placa, foram separados cinco grupos contendo discos de titânio estéreis, em triplicata, e um controle sem discos. O meio osteogênico foi trocado a cada 2 dias.

Para um volume final de 250mL de solução de meio osteogênico, as proporções foram de 2,5mL Penicilina/Streptomicina (1%) (Gibco, Grand Island, NY, EUA), 37,5mL de soro fetal bovino (15%) (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, EUA), 100 uM de ácido ascórbico(Sigma Aldrich), 10 uM de dexametasona (acetato de dexametasona 8mg/mL), 1,8mM de fosfato de potássio (Dinâmica química contemporânea Ltda, Indaiatuba, São Paulo) e α MEM (com glutamina) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para completar o volume final.

4.5.4 Ensaio de viabilidade celular MTT

O ensaio de viabilidade celular ou citotoxicidade é um teste bioquímico que quantifica a atividade mitocondrial, da mesma forma que testa a atividade citotóxica de um composto em uma determinada célula. O ensaio de MTT é um teste colorimétrico, onde os resultados são obtidos por uma reação de redução. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando um composto de coloração amarela em um de coloração azul escuro, chamado de formazan, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória. Por meio do ensaio, mede-se a formação de cristais de formazan pela solubilização desses e leitura da absorbância utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. A intensidade de coloração é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.

Os testes de MTT foram realizados 24 horas e 7 dias após a cultura celular. Para tal, aspirou-se o meio de cultura presente nos poços da microplaca e adicionou-se 10µL da solução de MTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) em cada poço (0,05g de MTT em 10mL de PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), bem homogeneizado-5mg/mL). Aos poços foram adicionados 90µL de meio de cultura sem soro fetal bovino. A placa foi incubada a 37°C por 2 a 3 hrs, protegida da luz. Por seguinte, o conteúdo dos poços foi aspirado e lavado uma vez com solução de PBS. Logo após, foi adicionado 50µL de DMSO(comum) e deixado agir por 10 minutos à temperatura ambiente, para dissolução dos cristais. Para a leitura, transferiu-se 50µL de cada poço para uma nova placa de cultura e a densidade óptica foi mensurada por um espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular devices), no comprimento de onda de 540 nm (GERLIER AND THOMASSET, 1986; Mosmann, 1983).

4.5.5 Ensaio de mineralização

As células osteoblásticas foram cultivadas por 21 dias. Após esse período, os poços foram aspirados e lavados cuidadosamente com solução de PBS, pH 7.4, por duas vezes. Em seguida, as células foram fixadas com solução de isopropanol 60%, diluído em água destilada, 200µL por poço, por um período de 10 minutos em ambiente de 22°C. O isopropanol, então, foi aspirado e os poços foram lavados com água destilada para reidratar as células. 200 µL de vermelho de alizarina (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) na concentração de 40 mM em pH 4,2 foram acrescentados em cada poço e deixados agir por 30 minutos sob leve agitação. Posteriormente, o corante foi aspirado e os poços foram cuidadosamente lavados com água destilada até que o sobrenadante ficasse transparente. Deixou-se a placa secar de um dia para o outro e, então, os discos foram fotografados.

Foram adicionados 200µL, por poço, de solução de ácido acético 10% em água destilada, mais metanol na proporção de 4:1 (ácido acético:metanol) e deixado sob agitação por 30 minutos.

Após a agitação, transferiu-se 200µL de cada poço para uma nova placa de cultura e a densidade óptica foi mensurada por um espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular devices) no comprimento de onda de 550 nm. Em seguida, a leitura foi realizada comparando a coloração de cada poço com a curva padrão do corante,

sendo que o ponto mais concentrado foi de 4000 μ M e as concentrações seguintes obtidas pelas diluições seriadas de 2 vezes (LIN, 2008).

4.5.6 Avaliação Morfológica

As células osteoblásticas foram cultivadas por 7 e 14 dias. Após esse período, os poços foram aspirados e lavados cuidadosamente por duas vezes com 150 μ L de solução tampão de fosfato à 0,1M. Em seguida, as células foram fixadas com 150 μ L/poço de solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato à 0,1M e deixadas por 24 horas a 40°C. Por seguinte, a solução fixadora foi removida e acrescentado 150 μ L de tampão fosfato à 0,1M. As etapas seguintes de processamento da amostra (fixação secundária com tetróxido de ósmio, desidratação, secagem em ponto crítico de CO₂, metalização e montagem em stubs) foram realizados pelo centro de microscopia da UFMG.

As amostras foram avaliadas pelo centro de microscopia da UFMG por meio do microscópio eletrônico de varredura FEG - Quanta 200 FEI (FEI, Hillsboro, Oregon, EUA), e, alto vácuo e com voltagem de 5 KV (quilovolt).

5 RESULTADOS

5.1 Rugosidade das superfícies

As médias de rugosidade dos cinco grupos foram comparadas pelos parâmetros de rugosidade aritmética (Sa) e rugosidade quadrática média (RMS), visualizadas pela tabela 1 e figuras 3 (a e b).

Tabela 1 - Valores médios dos parâmetros de rugosidade aritmética (Sa) e rugosidade quadrática média (RMS) em escala micrométrica (μm), por grupo experimental.

Grupos	Sa (μm)	RMS (μm)
G I	2,334	3,371
G II	2,086	3,090
G III	2,135	3,239
G IV	2,300	3,744
G V	2,427	3,151

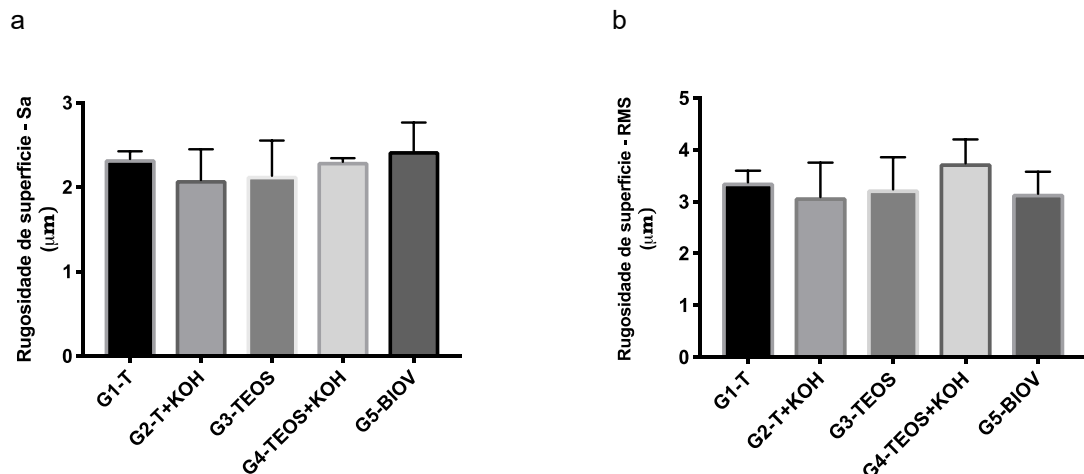


Figura 3a e b – Rugosidade aritmética (Sa) e rugosidade quadrática média (RMS) das superfícies dos grupos I, II, III, IV e V. Não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos I, II, III, IV e V ($p > 0,05\%$) (ANOVA seguido por teste de Tukey).

A rugosidade superficial média do substrato de titânio (grupo I) adquirida pelo jateamento com óxido de alumínio e duplo ataque ácido (HF/HNO₃) não apresentou alteração significativa após a aplicação dos revestimentos de vidro bioativo nos grupos III e IV e V.

5.2 Caracterização microestrutural da topografia de superfície por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de MEV revelaram características específicas na morfologia de superfície dos diferentes grupos, como visto nas imagens representativas das figuras 4,5,6,7 e 8.

A superfície de titânio (T) apresentou morfologia ondulada com vales e picos não regulares, com aspecto muito rugoso e poucas ranhuras residuais (FIGURAS 4 a, b, c, d).

A superfície de titânio (T+KOH) apresentou morfologia com vales e picos mais definidos, com aspecto muito rugoso e presença de precipitados de geometria cuboide no fundo das fossas, com dimensões em torno de 200 x 200 nanômetros (FIGURAS 5 a, b, c, d).

A superfície coberta com vidro bioativo (TEOS) apresentou um aspecto de superfície heterogeneamente rugosa, por apresentar regiões com grande frequência de picos e vales misturados a regiões de superfícies planas, com aspecto vítreo, derivadas das microplacas de craqueamento (FIGURAS 6 a, b, c, d).

A superfície coberta com vidro bioativo (TEOS+KOH) apresentou um aspecto similar ao grupo TEOS porém, exibiu um maior craqueamento e adição de precipitados espalhados sobre a superfície (FIGURAS 7 a, b, c, d).

A superfície coberta com vidro bioativo (BIOV) apresentou morfologia rugosa, com aspecto arenoso de grande porosidade, exibindo trincas micrométricas descontínuas em regiões características de picos (FIGURAS 8 a, b, c, d).

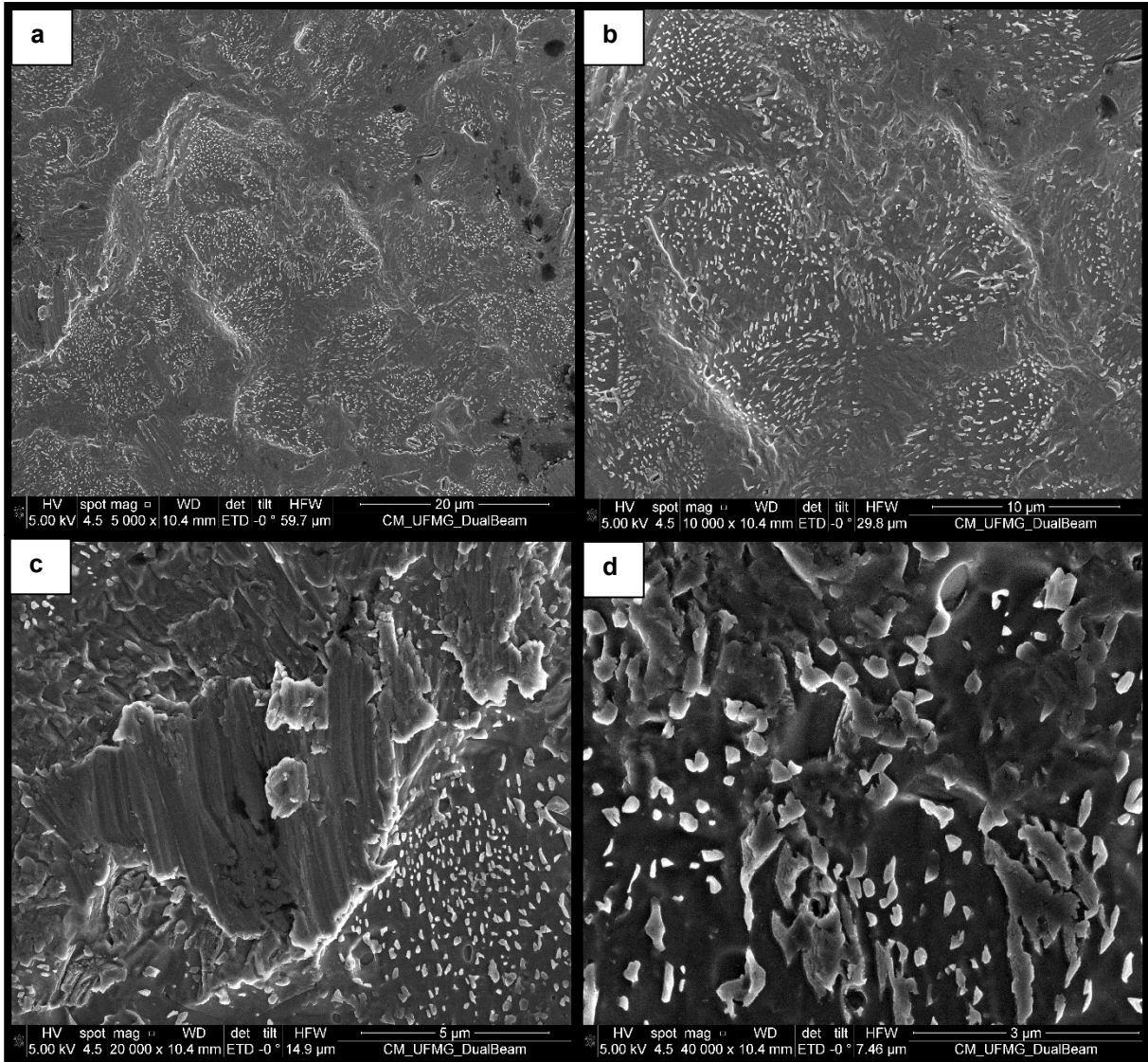


Figura 4 - Grupo I (T) – Aumento de 5000X (a), 10000X (b), 20000X (c) e 40000X (d)

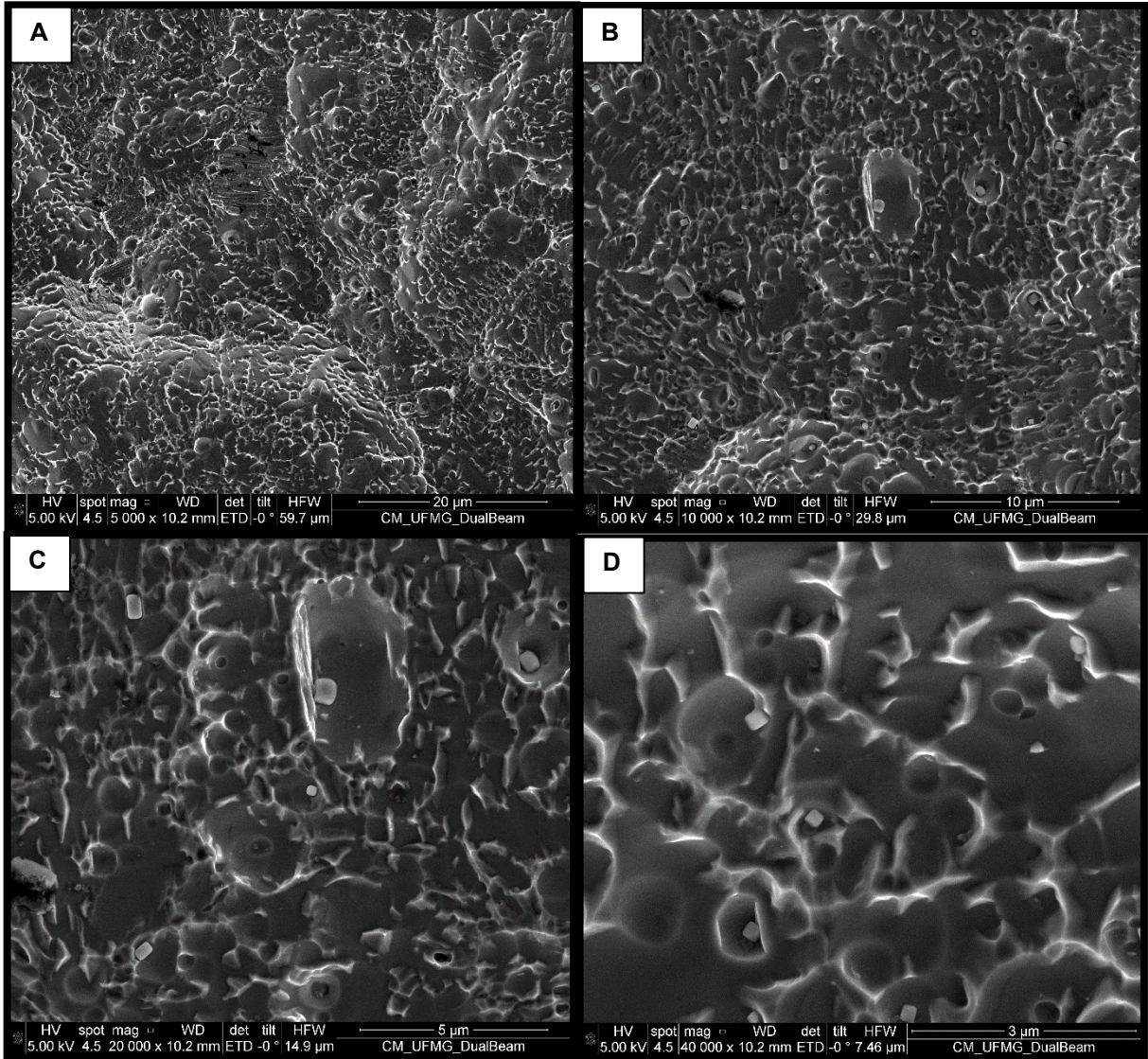


Figura 5 - Grupo II (T+KOH) – Aumento de 5000X (A), 10000X (B), 20000X (C) e 40000X (D)

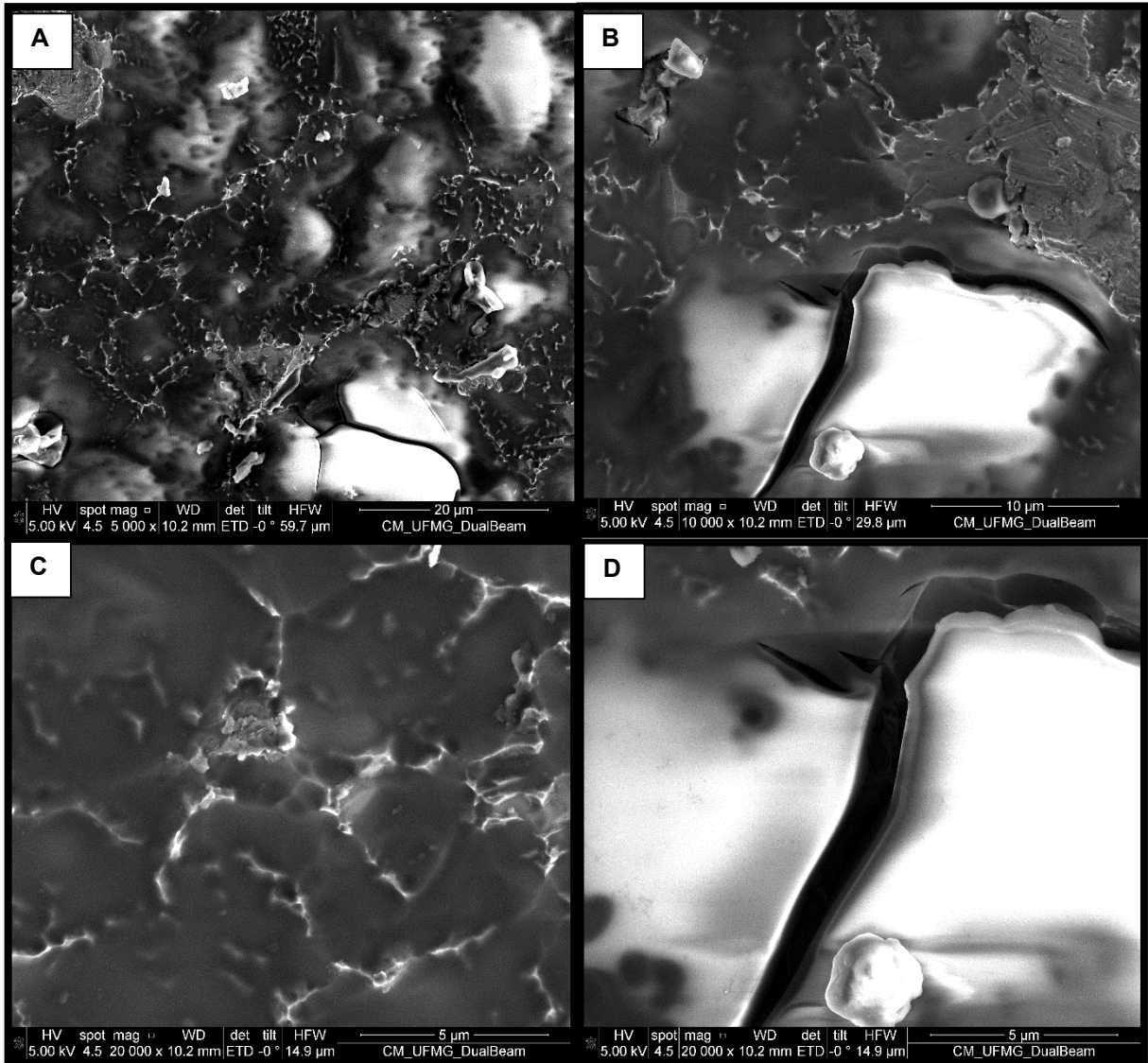


Figura 6 - Grupo III (TEOS) – Aumento de 5000X (A), 10000X (B), 20000X (C) e 20000X (D)

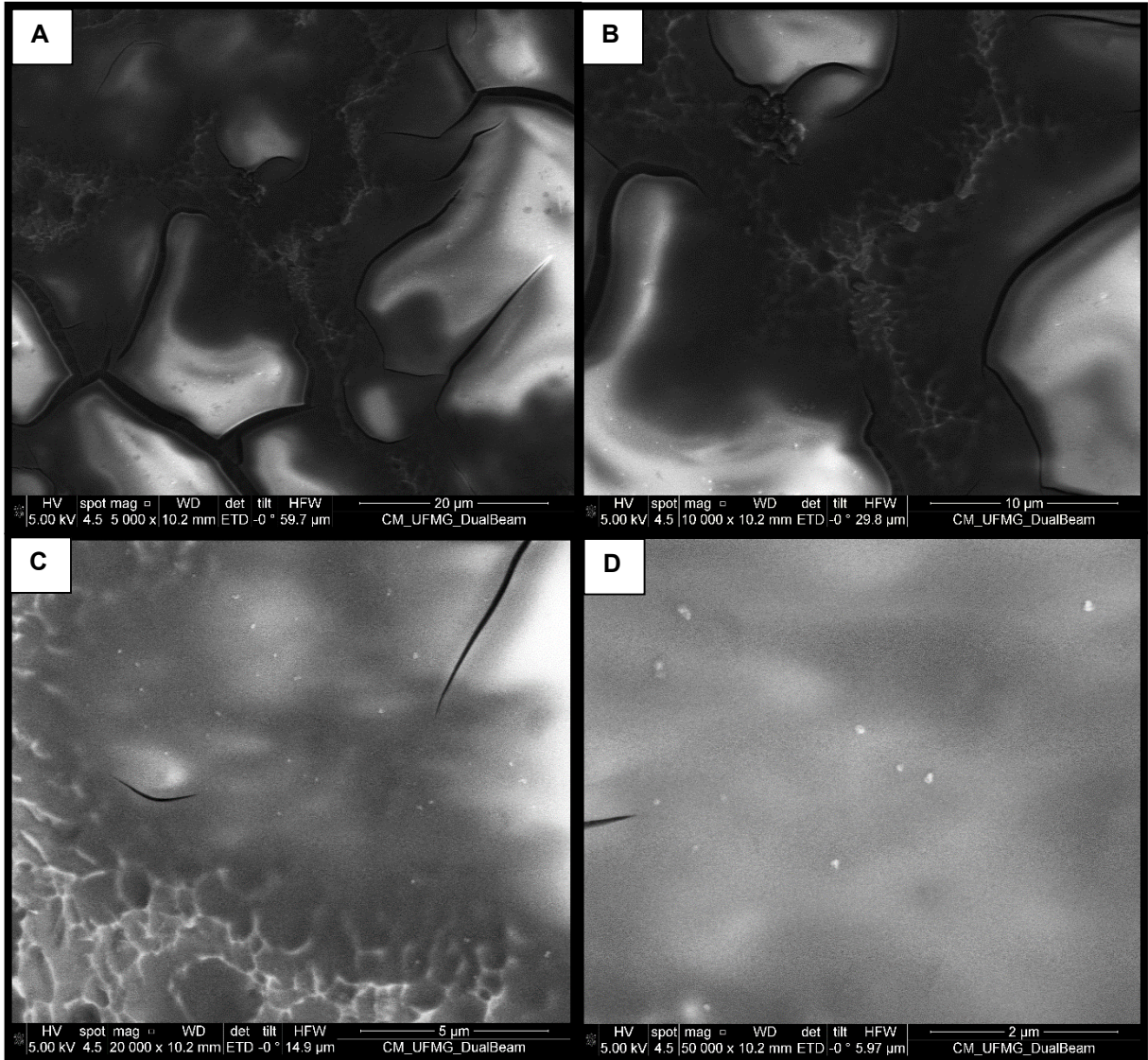


Figura 7 - Grupo IV (TEOS+KOH) – Aumento de 5000X (A), 10000X (B), 20000X (C) e 50000X (D)

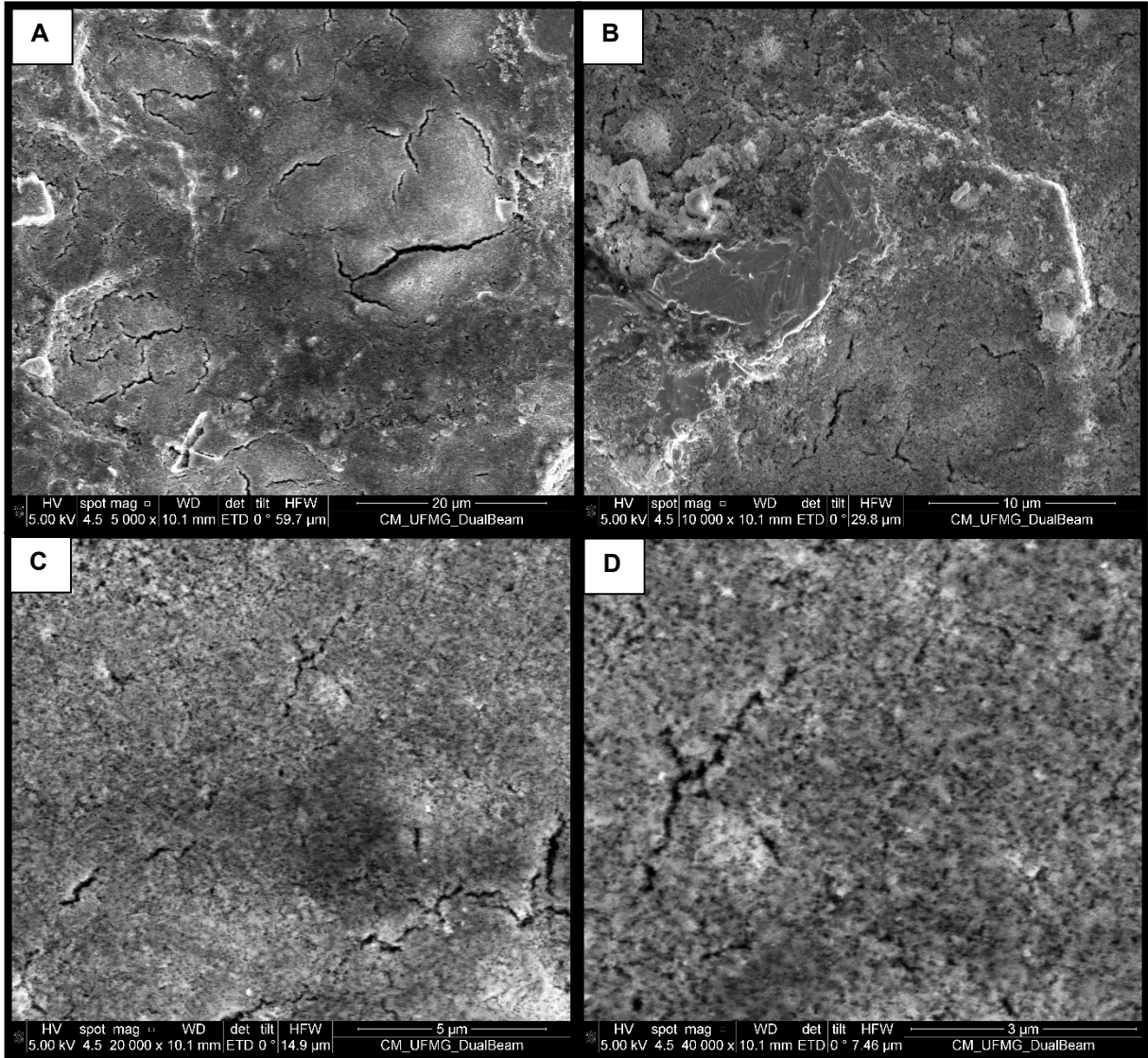


Figura 8 - Grupo V (BIOV) – Aumento de 5000X (A), 10000X (B), 20000X (C) e 40000X (D)

5.3 Análise de espessura e composição química dos filmes de recobrimento realizados pelo MET (Microscopia eletrônica de transmissão)

As lamelas das amostras foram analisadas por MET com o objetivo de se medir a espessura do recobrimento sobre a superfície de titânio (exclusiva para os grupos III, IV e V) e a composição química das superfícies. Os resultados de EDS e de EELS das amostras confirmam a presença de Si na composição do vidro bioativo, utilizado como recobrimento nos grupos III, IV e V. O espectro de perda de energia próximo à estrutura de borda (ELNES – *energy loss near edge structure*) do vidro bioativo mostra que o Si é ligeiramente oxidado em relação a Si puro, mas seu estado de oxidação é menor do que em SiO₂ padrão. Isso é evidenciado no espectro (FIGURA 9) pelo deslocamento químico da borda L_{2,3} (2p) do Si no vidro bioativo em relação à amostra padrão de SiO₂, bem como pela razão entre as bandas L3 e L2 (L3/L2). Uma análise visual dos espectros na Figura 12 evidencia que a razão L3/L2 do Si no vidro bioativo é maior que no Si puro, e menor do que no SiO₂.

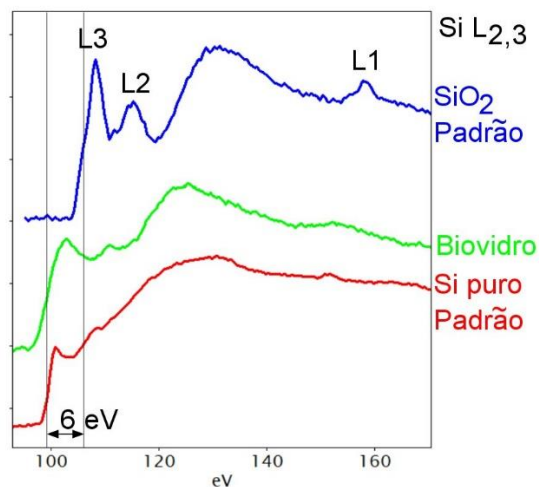


Figura 9 - Espectros de perda de energia de elétrons próximo à estrutura de borda (ELNES) da borda estendida L do Si, Si L_{2,3} (2p), para amostras de Si puro padrão*, SiO₂ padrão*, e o espectro experimental do vidro bioativo. O deslocamento químico de aproximada 6 eV da borda L do Si do vidro bioativo em relação ao SiO₂ e as diferentes razões entre as bandas L3 e L2 (L3/L2) indicam que o Si tem diferentes estados de oxidação em cada uma dessas três espécies. *Fonte: <http://www.eels.info/atlas/silicon>, acessado em 24/03/2019.

Os dados de MET mostram que o vidro bioativo é amorfo e apresenta variações de espessura entre as amostras dos grupos III, IV e V, como mostra a Tabela 2. As Figuras 10, 11, 12 e 13 mostram os dados de MET, EDS e EELS para as amostras.

Tabela 2 - Espessura da cobertura de vidro bioativo dos grupos III, IV e V

Amostra	Espessura do vidro bioativo
Grupo III (TEOS)	7,55 nm
Grupo IV (TEOS+KOH)	90,36 nm
Grupo V (BIOV)	1,02 um

Análises de MET das amostras sem vidro bioativo dos grupos (T) e (T+KOH) mostram predominantemente sinal de Ti na superfície do substrato de titânio, e também sinal de Si (FIGURA 10). O sinal de Ga é devido aos íons de gálio que são implantados na amostra durante processo de preparação da lamela por feixe de íons focalizados. O sinal de Cu é proveniente de raios-X secundários gerados da interação de elétrons retroespalhados na peça polar da lente objetiva do microscópio de transmissão e que excitam raios-X de cobre do suporte de amostra. Os espectros de EDS (c,d) mostram a composição elementar na interface entre o substrato de titânio e a platina depositada por feixe de íons focalizados (ponto 1 indicado nas imagens a,b), respectivos as amostras dos grupos (T) e (T+KOH).

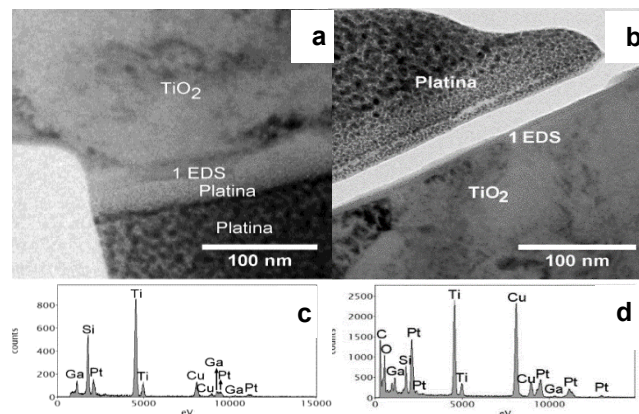


Figura 10 - Imagens de MET em campo claro das lamelas das amostras dos grupos T (a) e T+KOH (b) e espectros de EDS (c,d) referentes aos pontos "1 EDS" indicados nas imagens a e b, respectivamente.

Numa análise qualitativa por EELS, os teores de Si e Ti foram avaliados ao longo de um perfil em linha, perpendicularmente à orientação do vidro bioativo. Os resultados são mostrados nas Figuras 11(c) e 12(a) e 13(a). Os resultados mostram que o sinal de Si é proveniente apenas da região identificada como vidro bioativo nas

imagens de MET. Isso também é mostrado pelas análises de EDS, comparando-se os espectros de raios-X na região do vidro bioativo e na região do titânio (FIGURAS 12 (b, c) e 13 (b, c)).

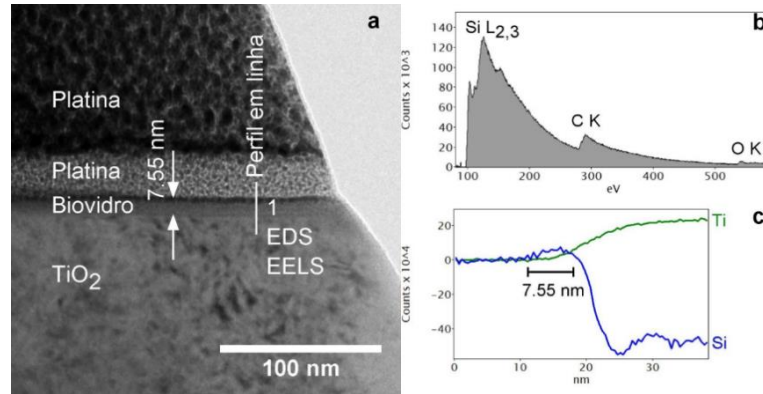


Figura 11 - (a) Imagem de MET em campo claro da amostra do grupo (TEOS); (b) espectro de EEL do biovidro feito no ponto 1 indicado na imagem à esquerda; (c) perfil de contagem de sinal de Si e de Ti por EELS ao longo da linha perpendicular ao biovidro mostrada na imagem à esquerda.

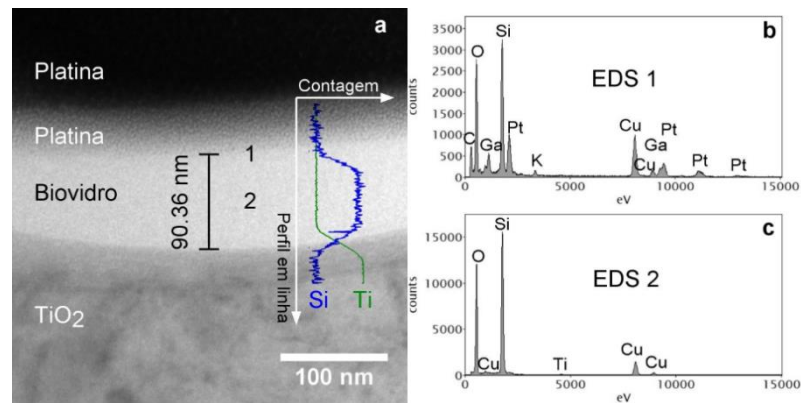


Figura 12 - (a) Imagem de MET em campo claro da amostra do grupo (TEOS+KOH), mostrando o perfil de contagem de sinal de Si e de Ti por EELS ao longo da linha perpendicular ao biovidro; (b,c) espectros de EDS dos pontos 1 e 2 mostrados na imagem à esquerda.

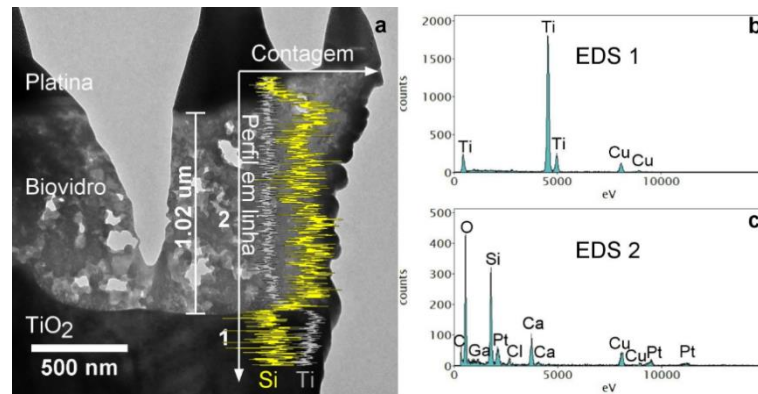


Figura 13 - (a) Imagem de MET em campo claro da amostra do grupo (BIOV), mostrando o perfil de contagem de sinal de Si e de Ti por EELS ao longo da linha perpendicular ao biovidro; (b,c) espectros de EDS dos pontos 1 e 2 mostrados na imagem à esquerda, respectivamente.

5.4 Análise de composição química realizada por Espectroscopia de Raio X por Dispersão em Energia (EDS) no MEV

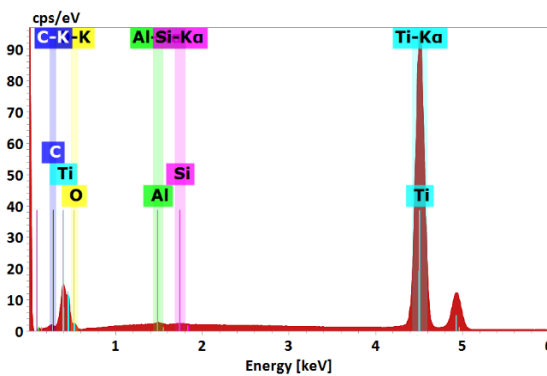


Figura 14 - Grupo I - Mapa de espectroscopia de raio x

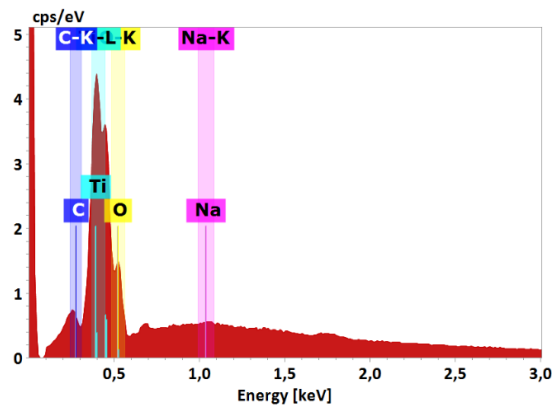


Figura 15 - Grupo II - Mapa de espectroscopia de raio x

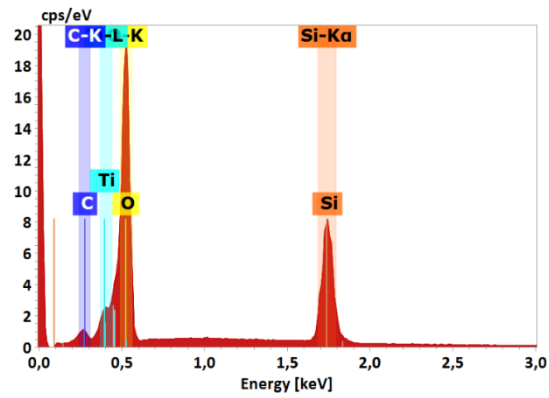


Figura 16 - Grupo III- Mapa de espectroscopia de raio x

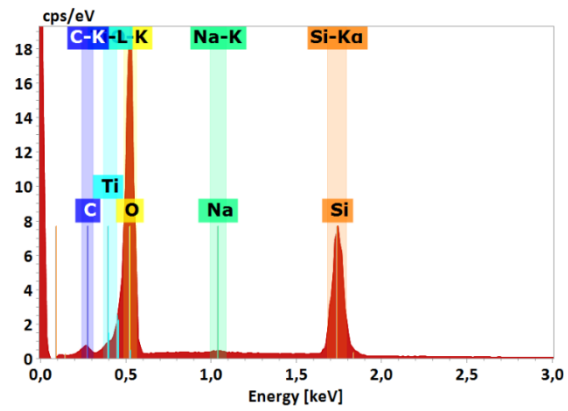


Figura 17 - Grupo IV- Mapa de espectroscopia de raio x

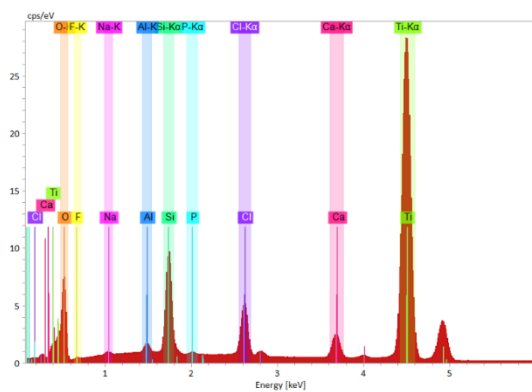


Figura 18 - Grupo V- Mapa de espectroscopia de raio x

5.5 Espectroscopia de Fotoelétrons excitado por Raio X (XPS)

Amostra do grupo I (T)

Na superfície desta amostra foram encontrados os seguintes elementos:

- C (carbono) – 59%
- O (oxigênio) – 32%
- Ti (titânio) – 5%
- Si (silício) – 3%
- Ca (cálcio) – 1%

Espécimes determinadas a partir do espectro XPS utilizando radiação $K\alpha$ do anodo de magnésio (Energia do fóton: 1253,6 eV/ Largura da linha: 0,7 eV). Podem ser observadas no espectro completo de baixa resolução na Figura 19.

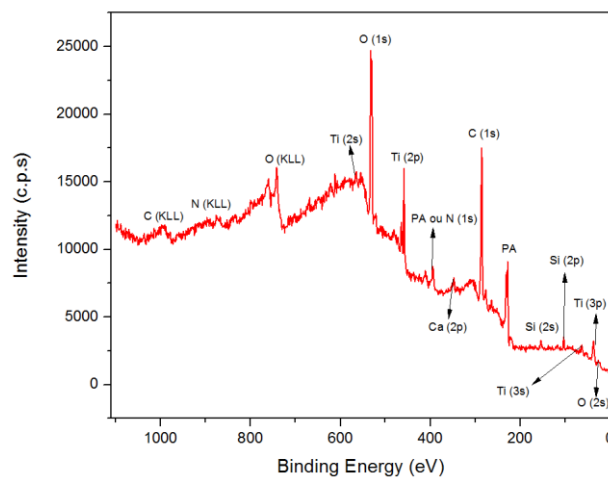


Figura 19 - Espectro XPS de baixa resolução da amostra do grupo I (T)

A Figura 20 mostra o espectro de alta resolução na faixa de energia do oxigênio (O1s), é possível observar que existe um dubleto com picos principais medidos em 532,18 eV e 529,58 eV. Foi necessário utilizar um ajuste com 4 gaussianas. Em 529,58 eV existe um pico gaussiano que indica a ligação com titânio sob a forma de TiO_2 e representa 40% de todo o oxigênio da amostra. O pico gaussiano na posição de 532,9 eV pode indicar a existência de ligação do tipo cálcio-

oxigênio, possivelmente CaCO_3 e/ou ligações do tipo C-O-H (16% do oxigênio total na amostra), a ligação com titânio sob a forma de Ti_2O_3 e/ou ligação com carbono sob a forma de C=O aromático é representada pelo pico gaussiano ajustado na posição de 530,8 eV (4% do oxigênio na amostra). Já na posição de 531,98 eV, foi ajustado um pico gaussiano que representa ligações de silício e oxigênio, possivelmente sob a forma SiO_2 (e outras fases Si-O) e soma 40% do oxigênio total disponível na amostra.

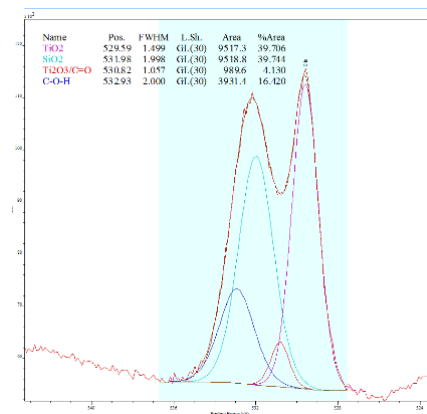


Figura 20 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra do grupo I (T)

O espectro de alta resolução na faixa de energia do titânio ($\text{Ti}2p$) pode ser visto na Figura 21. O dubleto 2p medido tem o pico correspondente ao nível eletrônico $2p_{3/2}$ (de maior intensidade) na posição de 458,9 eV. É possível notar, também, um ombro na posição de 458,01 eV. Foi possível ajustar 2 picos gaussianos, em 458,24 eV e 463,84 eV, que correspondem ao TiO_2 e somam 82% do titânio na amostra e mais dois picos, em 457 eV e 461,61 eV, que representam Ti_2O_3 (18% do titânio total da amostra).

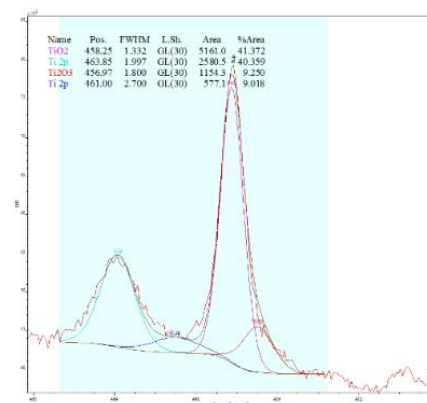


Figura 21 - Espectro XPS de alta resolução da amostra do grupo I (T) na faixa de energia do titânio 2p.

Na Figura 22 é possível observar o espectro de alta resolução na faixa de energia do carbono (C1s) que possui um pico medido em 284,9 eV, um ombro em 288,6 eV e outro em 282,29 eV. No ajuste foram necessárias 4 gaussianas. Em 282,71 eV, é possível observar um pico gaussiano que representa ligações sob forma de carbeto, possivelmente SiC (cerca de 4% do carbono total na superfície da amostra). O pico gaussiano localizado em 285,00 eV representa ligações entre carbono-nitrogênio e carbono-carbono (70% do carbono presente na amostra). Em 286,67 eV, existe um pico gaussiano que representa a ligação carbono-oxigênio-hidrogênio (18% do carbono disponível na superfície da amostra). O pico gaussiano localizado em 288,66 eV confirma a presença de ligações do tipo COOR e/ou CaCO₃ (8% do carbono total da amostra).

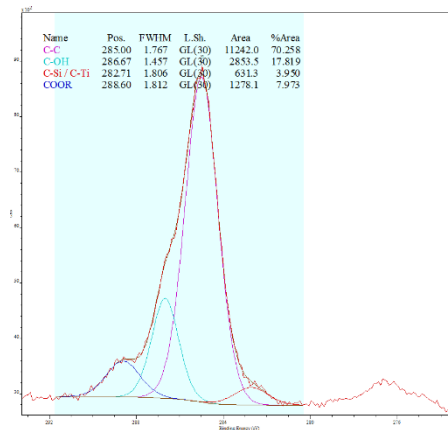


Figura 22 - Espectro XPS de alta resolução da amostra do grupo I na faixa de energia do carbono 1s.

Em conclusão, a maior parte do carbono da superfície da amostra de Ti-Puro do grupo I (T) (90% do carbono total da amostra) representa contaminações devido a exposição com a atmosfera. Se essas contaminações forem desconsideradas, estima-se que cerca de 40% da amostra é composta por TiO₂, 40% de SiO₂ (ou alguma fase SiO_x) e 20% da superfície da amostra é formada pela fase Ti₂O₃, CaCO₃ e compostos aromáticos C=O. A possibilidade da presença de CaCO₃ pode ser reforçada observando a posição dos demais picos referentes ao cálcio: 3p (25,28 eV), 3s (43,4 eV) e 2s (438 eV).

Amostra do grupo II (T+KOH)

Na superfície desta amostra foram encontrados os seguintes elementos:

- C (carbono) – 53%
- O (oxigênio) – 35%
- Ti (titânio) – 7%
- Si (silício) – 4,2%
- Ca (cálcio) – 0.8%

A Figura 23 mostra o espectro de alta resolução na faixa de energia do oxigênio (O1s), é possível observar que existe o dubleto com as mesmas componentes observadas anteriormente no Ti-Puro. 57% do oxigênio está sob forma de TiO_2 , 24% do oxigênio disponível na superfície da amostra está ligado ao silício sob a forma de SiO_2 ou algum outro estado de oxidação, 5% do oxigênio está sob a forma de Ti_2O_3 e/ou ligações C=O e 14% sob a forma de ligações carbono-oxigênio-hidrogênio.

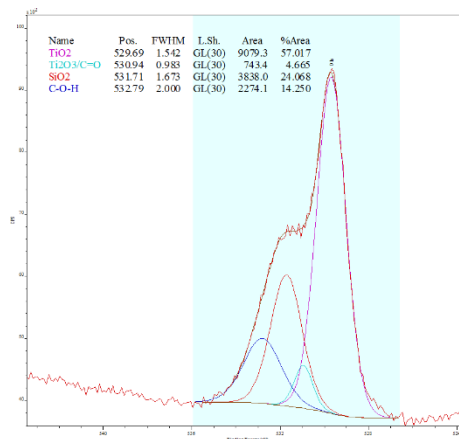


Figura 23 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra T+KOH

A Figura 24 mostra o espectro de alta resolução na faixa de energia do silício 2p. Detectamos a presença de carbeto de silício (SiC), que também aparece no espectro de alta resolução do carbono 1s (em 282,64 eV – Figura 25), fase de oxidação intermediária SiO_x e SiO_2 .

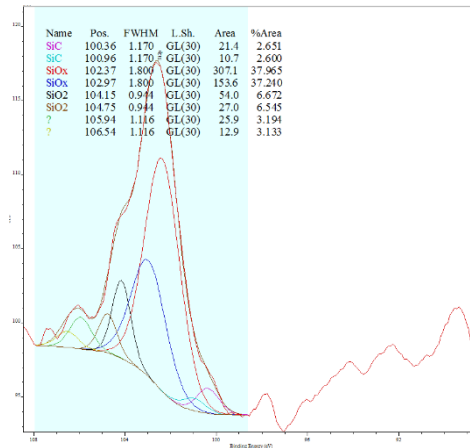


Figura 24 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do silício 2p da amostra T+KOH

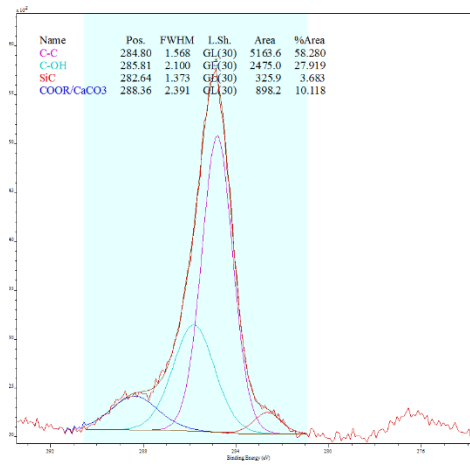


Figura 25 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do carbono 1s da amostra T+KOH

Em conclusão, a maior parte do carbono da superfície da amostra Ti+KOH (58% do carbono total da amostra) representa contaminações devido a exposição com a atmosfera. Se essas contaminações forem desconsideradas, estima-se que cerca de 17% da amostra é composta por SiO₂ ou alguma fase intermediária SiO_x, 1% da superfície da amostra é formada por carbeto de silício, 42% da superfície da amostra é formada pela fase TiO₂, menos de 4% pela fase Ti₂O₃. 36% da superfície da amostra é composta por ligações carbono-oxigênio-hidrogênio e há, possivelmente, um resquício de CaCO₃. Não foi encontrado traços de potássio.

Amostra do grupo III (TEOS)

Na superfície desta amostra foram encontrados os seguintes elementos:

- C (carbono) – 36%
- O (oxigênio) – 42%
- Ti (titânio) – 0,9%
- Si (silício) – 20,4%
- Ca (cálcio) – 0,7%

Espécimes determinadas a partir do espectro XPS utilizando radiação K α do anodo de magnésio (Energia do fóton: 1253,6 eV/ Largura da linha: 0,7 eV). Podem ser observadas no espectro completo de baixa resolução na Figura 26.

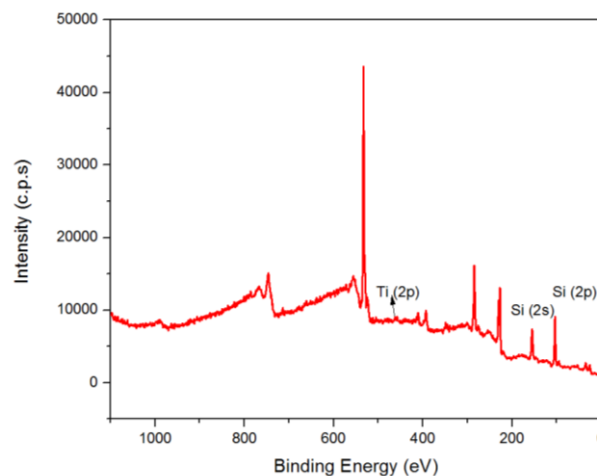


Figura 26 - Espectro XPS de baixa resolução da amostra do grupo TEOS

A Figura 27 é o espectro de alta resolução na faixa de energia do silício. Nota-se presença de 1 pico medido em 104,74 eV na banda 2p, a energia proveniente da interação de spin-órbita típica para a banda 2p do silício é de 0,6 eV, sabendo disso, foi possível ajustar 3 picos gaussianos principais: em 100,6 eV é, possivelmente, devido a presença de interações do tipo Si-C como, por exemplo, o carbeto de silício (1% do silício total da amostra). A presença de um pico gaussiano em 103,5 eV e outro em 104,85 eV pode ser explicada pela existência de SiO $_x$ (com

um grau de oxidação menor que do dióxido de silício, correspondendo a 35% do total do silício na amostra) e SiO_2 (64% do silício presente na superfície da amostra).

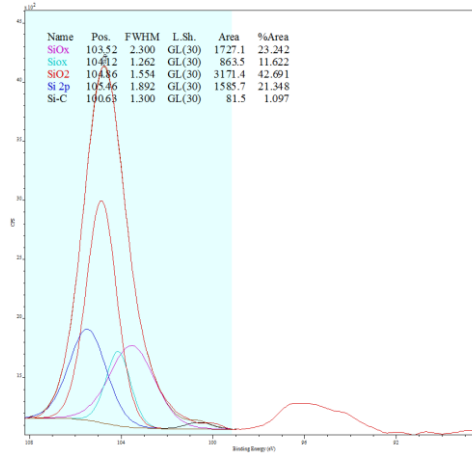


Figura 27 - Espectro XPS de alta resolução da amostra do grupo TEOS na faixa de energia do silício 2p

Na figura 28 está representado o espectro XPS na faixa de energia do oxigênio 1s. Podemos observar que o pico que representa as ligações Si-O (em 533,56 eV) se torna mais pronunciado, atribui-se esse efeito à presença de SiO_2 . Em 529,5 eV existe um pico gaussiano que está relacionado, principalmente, a presença de TiO_2 . Em 531,6 eV, o pico gaussiano ajustado está representando, possivelmente, ligações de C=O aromáticas. É importante frisar que a distância de separação entre o dubleto sofreu um aumento com relação a distância de separação do dubleto correspondente ao pico 1s do oxigênio na amostra Ti-Puro de 2,39 eV para 4,06 eV.

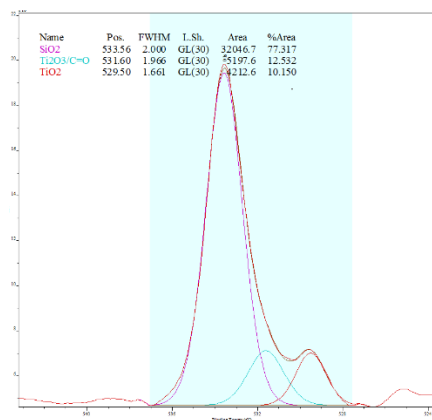


Figura 28 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra do grupo TEOS

O espectro XPS na faixa de energia do carbono 1s está representado na Figura 29. O pico gaussiano ajustado na energia de ligação igual a 285,7 eV corresponde, provavelmente, a ligações de carbono-nitrogênio. As ligações que indicam a presença de carvão e de ligações C=O aromática estão representadas pelos picos cujas energias são 282,21 eV e 288,3 eV, respectivamente.

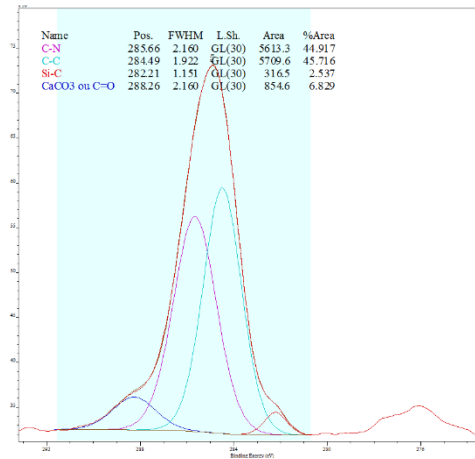


Figura 29 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do carbono 1s da amostra do grupo TEOS

O espectro de alta resolução na faixa de energia do titânio (Ti2p) pode ser visto na Figura 30. Encontra-se novamente a presença de TiO₂ (75% do titânio total na amostra) e Ti₂O₃ (25% do titânio total na amostra).

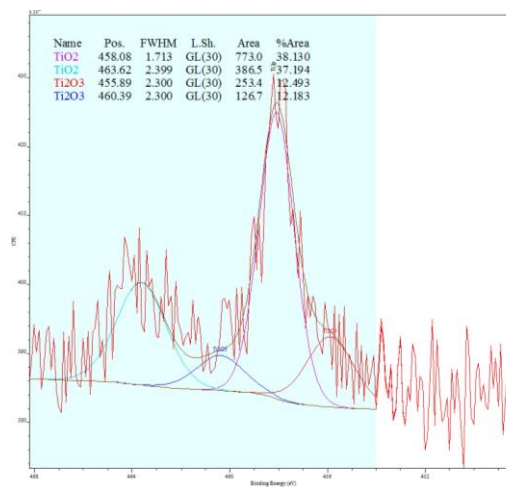


Figura 30 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do titânio 2p da amostra do grupo TEOS

Em conclusão, a maior parte do carbono da superfície da amostra de biovidro do grupo TEOS (cerca de 95% do carbono total da amostra) representa contaminações devido a exposição com a atmosfera. Se essas contaminações forem desconsideradas, estima-se que cerca de 77% da amostra é composta por SiO_2 (ou alguma fase SiO_x), 12% da superfície da amostra é formada por TiO_2 (juntamente com a fase Ti_2O_3) e cerca de 11% por ligações aromáticas do tipo $\text{C}=\text{O}$.

Amostra do grupo IV (TEOS+KOH)

Na superfície desta amostra foram encontrados os seguintes elementos:

- C (carbono) – 40%
- O (oxigênio) – 42%
- Ti (titânio) – 2%
- Si (silício) – 16%

A Figura 31 é o espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s. É possível notar que o pico correspondente a ligações do tipo SiO_2 se torna preponderante com relação ao pico correspondente a ligações $\text{Ti}-\text{O}$. Esse espectro é bastante similar ao espectro de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra TEOS. Na Figura 32 é possível notar que a contribuição das ligações SiO_2 se torna mais importante para a composição do pico $\text{Si}2p$ medido, que das ligações intermediárias SiO_x e o formato da curva é, também, similar ao da amostra TEOS, porém está deslocado em energia com relação ao pico $\text{Si}2p$ da amostra TEOS em aproximadamente -1 eV. Isso se deve, possivelmente, a ação de cargas que estariam se acumulando na superfície, tornando-a carregada com relação ao porta amostras (PA). Esse fenômeno também foi observado para o pico do titânio.

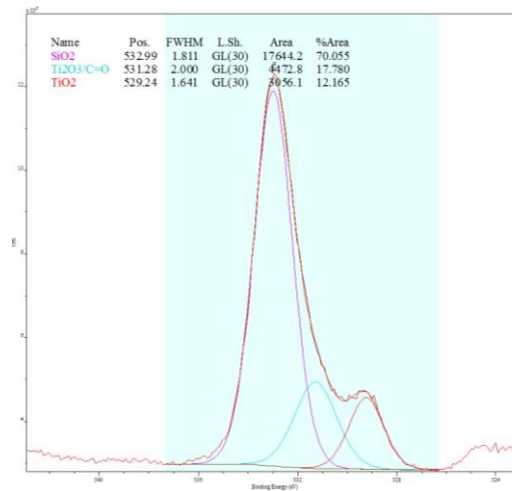


Figura 31 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra TEOS+KOH

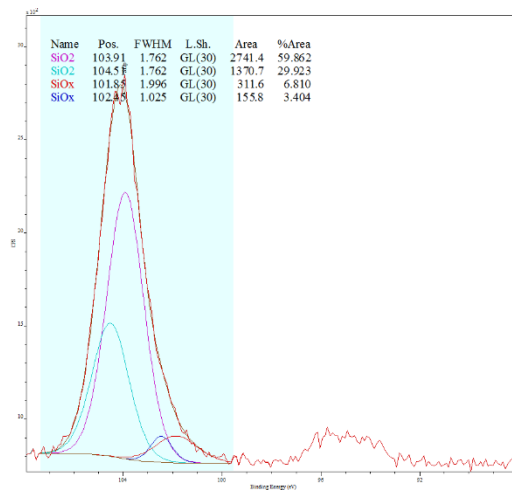


Figura 32 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do silício 2p da amostra TEOS+KOH

Em conclusão, a maior parte do carbono da superfície da amostra TEOS+KOH (90% do carbono total da amostra) representa contaminações devido a exposição com a atmosfera. Se essas contaminações forem desconsideradas, estima-se que cerca de 58% da amostra é composta por SiO₂ ou alguma fase intermediária SiO_x, 2% da superfície da amostra é formada por carbeto de silício, 10% da superfície da amostra é formada pela fase TiO₂, 12% pela fase Ti₂O₃. 18% da superfície da amostra é composta por ligações aromáticas do tipo C=O. Há, possivelmente, resquício de CaCO₃.

Amostra do grupo V (BIOV)

Na superfície desta amostra foram encontrados os seguintes elementos:

- C (carbono) – 39%
- O (oxigênio) – 38,9%
- Ti (titânio) – 1,5%
- Si (silício) – 16%
- Ca (cálcio) – 3%
- Cl (cloro) – 1,6%

Espécimes determinadas a partir do espectro XPS utilizando radiação $K\alpha$ do anodo de magnésio (Energia do fóton: 1253,6 eV/ Largura da linha: 0,7 eV). Podem ser observadas no espectro completo de baixa resolução na Figura 33.

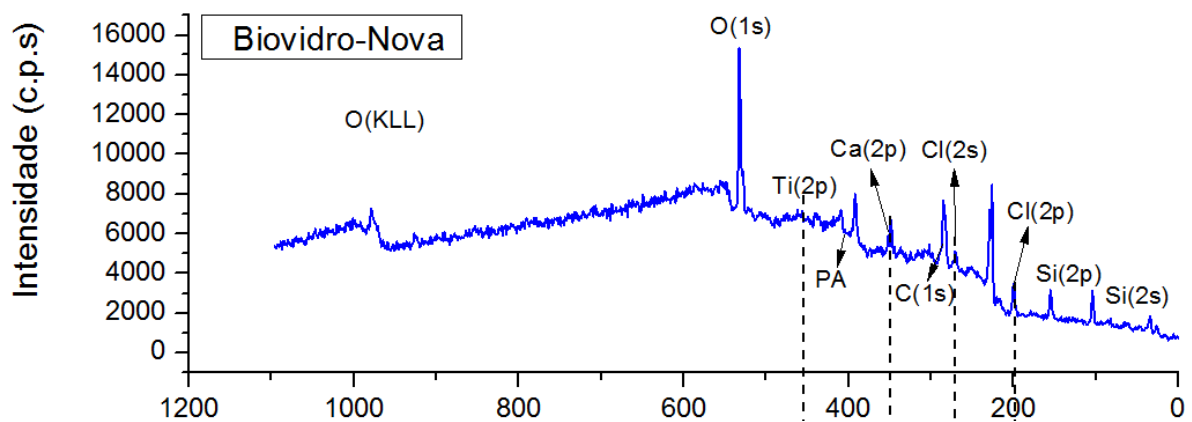


Figura 33 - Espectro XPS de baixa resolução da amostra do grupo BIOV

A Figura 34 é o espectro de alta resolução na faixa de energia do silício. Nota-se presença de 1 pico medido em 105,58 eV na banda 2p. É possível observar a presença de SiO_2 (34% do silício total na superfície da amostra) e SiO_x (66% do silício).

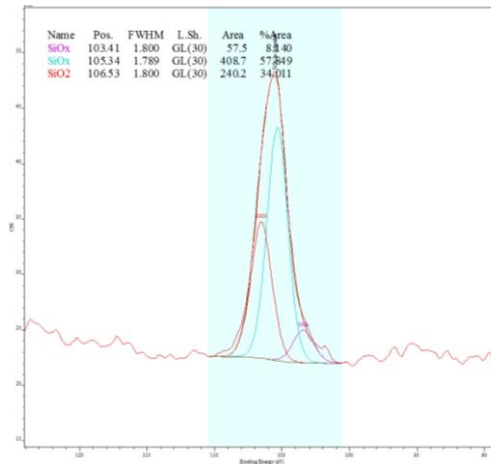


Figura 34 - Espectro XPS de alta resolução da amostra do grupo BIOV na faixa de energia do silício 2p

Na Figura 35 está representado o espectro XPS na faixa de energia do oxigênio 1s. Podemos observar que o pico que representa as ligações Si-O (em 534,37 eV) se torna mais pronunciado, atribui-se esse efeito à presença de SiO₂. Em 529,66 eV existe um pico gaussiano que está relacionado, principalmente, a presença de TiO₂. Em 532,24 eV, o pico gaussiano ajustado está representando, possivelmente, ligações Ti₂O₃ e/ou C=O aromáticas. É importante frisar que a distância de separação entre o duplete sofreu um aumento com relação a distância de separação do duplete correspondente ao pico 1s do oxigênio na amostra Biovidro de 2,27 eV para 4,71 eV.

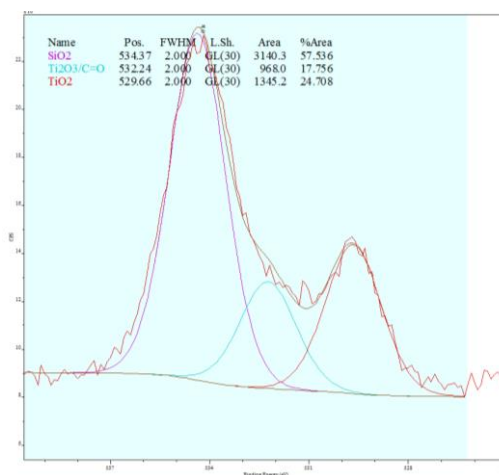


Figura 35 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do oxigênio 1s da amostra do grupo BIOV

O espectro XPS na faixa de energia do carbono 1s está representado na Figura 36. O pico gaussiano ajustado na energia de ligação igual a 284,94 eV corresponde, provavelmente, a ligações de carbono-carbono. As ligações que indicam a presença de carvão já não foram observadas no espectro e as ligações $\text{CaCO}_3/\text{C}=\text{O}$ aromática estão representada pelo pico cuja energia é 287,88 eV.

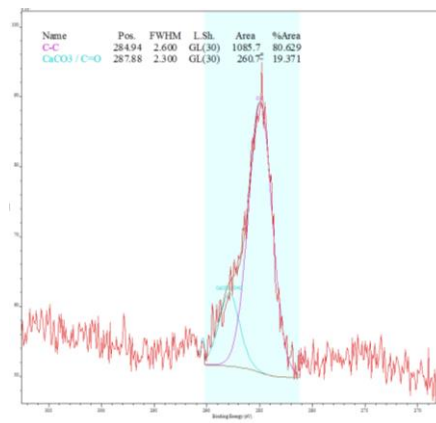


Figura 36 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do carbono 1s da amostra do grupo BIOV

O espectro de alta resolução na faixa de energia do titânio (Ti2p) pode ser visto na Figura 37. Encontra-se novamente a presença de TiO_2 (85% do titânio total na amostra) e Ti_2O_3 (15% do titânio total na amostra).

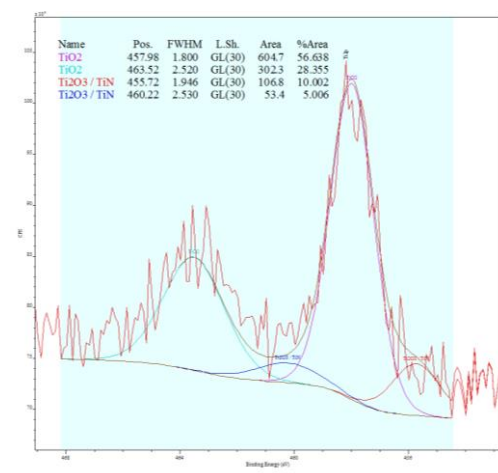


Figura 37 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do titânio 2p da amostra do grupo BIOV

A Figura 38 mostra o espectro XPS de alta resolução na região do cálcio 2p. O pico 2p_{3/2} do dubleto foi ajustado na posição 348,48 eV e foi utilizado o spin-orbita (separação entre os picos) de 3,55 eV. É possível atribuir as posições relativas dos picos à presença de CaCl₂. Além disso, o pico 2p no espectro XPS de baixa resolução da amostra foi medido na posição de energia igual a 199,5 eV que também indica a presença de ligação Ca-Cl.

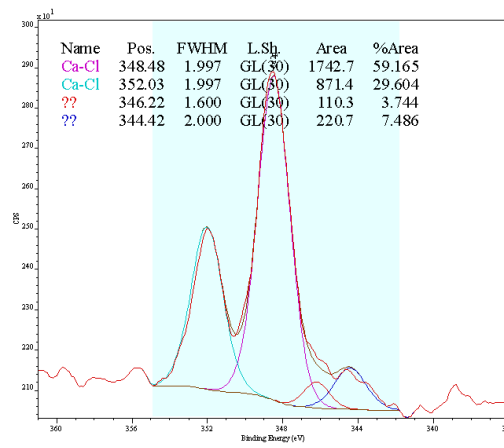


Figura 38 - Espectro XPS de alta resolução na faixa de energia do cálcio 2p da amostra do grupo BIOV.

Em conclusão, a maior parte do carbono da superfície da amostra de vidro bioativo do grupo BIOV (cerca de 80% do carbono total da amostra) representa contaminações devido a exposição com a atmosfera. Se essas contaminações forem desconsideradas, estima-se que cerca de 53% da amostra é composta por SiO₂ (ou alguma fase SiO_x), 22% da superfície da amostra é formada por TiO₂ (juntamente com a fase Ti₂O₃), cerca de 25% por ligações aromáticas do tipo C=O aromáticas.

5.6 Hidrofilicidade de superfície

Na Figura 39 é representado o ângulo de contato formado entre a gota de água destilada e a superfície da amostra, medido nos tempos de 1, 120 e 180 segundos. Nota-se que em todos os grupos, a diminuição do ângulo de contato se deu de forma contínua, quase linear, ao longo do tempo. Na Figura 40, as medidas médias dos ângulos de contato indicam que todas as superfícies são moderadamente hidrofílicas porém, o grupo (BIOV) apresenta uma hidrofilicidade significativamente maior do que os grupos I, III e IV, por apresentar um menor ângulo de contato ($p < 0,05$). O grupo II

não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo V ou aos demais grupos. Os grupos I, II, III, e IV não apresentaram diferenças significativas entre si.

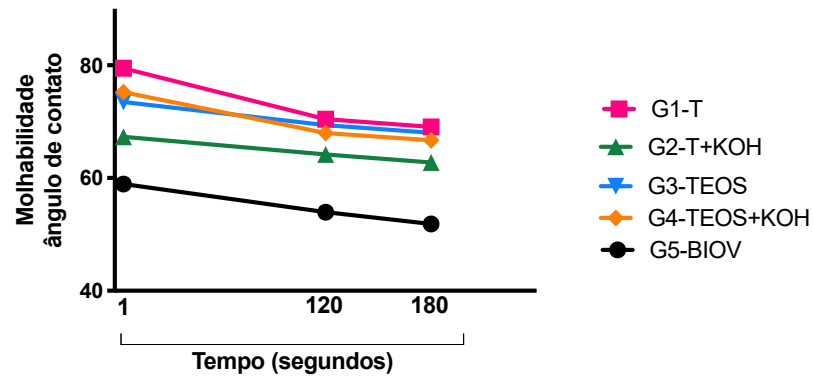


Figura 39 - Ângulo de contato entre a gota de água destilada e a superfície das amostras dos grupos I, II, III, IV, e V nos tempos de 1, 120 e 180 segundos.

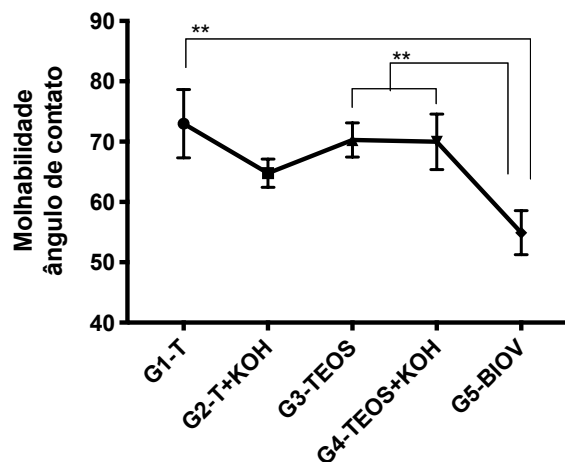


Figura 40 - Ângulo de contato médio dos grupos I, II, III, IV e V. ANOVA - Tukey's multiple comparisons test $**p < 0,001$

5.7 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade das células osteoblásticas foi avaliada pelo ensaio de MTT em dois períodos distintos: 24 horas e 7 dias (FIGURA 41). A produção de formazan MTT dada pela absorbância revela o número de células viáveis nos diferentes grupos. Em ambos os ensaios (24hrs, 7dias), observa-se que a presença dos discos, por si

só, criou um ambiente menos viável para as células do que o do meio controle, sem discos. Observando separadamente os ensaios, é possível relatar ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos testados (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Ao comparar o nível de absorvância entre os ensaios, 24 hrs e 7 dias, observa-se um aumento significativo na viabilidade celular em todos os grupos.

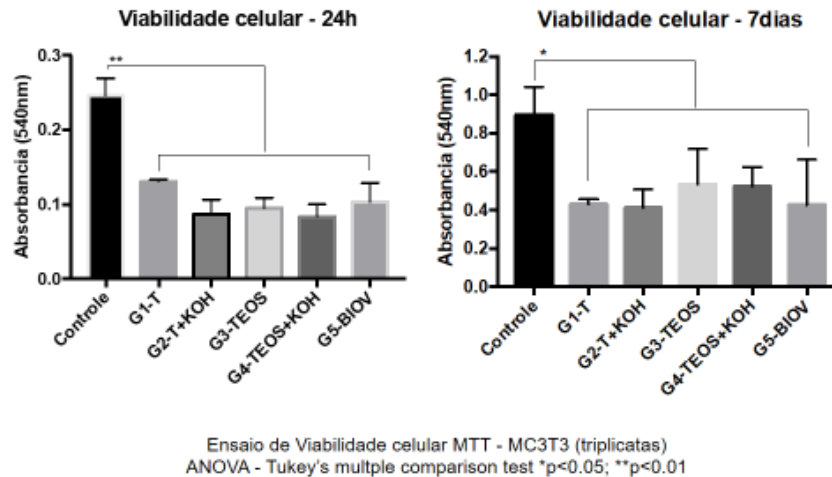


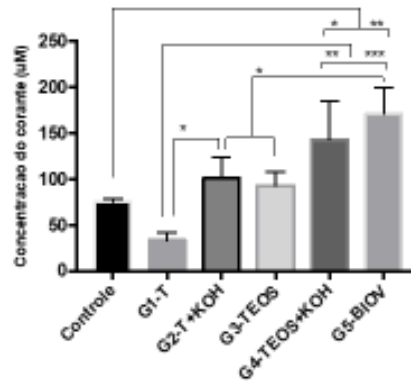
Figura 41 - Viabilidade celular de osteoblastos cultivados em 24 horas e 7 dias nos grupos controle, T, T+KOH, TEOS, TEOS+KOH, BIOV, medida em absorvância.

5.8 Ensaio de Mineralização (Alizarina)

A produção de nódulos de mineralização na matriz óssea foi avaliada pelo ensaio vermelho de alizarina após 21 dias de cultura. Os resultados de mineralização são dados pela concentração do corante em μM (FIGURA 42). O grupo BIOV apresentou, estatisticamente, a maior concentração de nódulos de mineralização do que os demais grupos, com exceção para o grupo TEOS+KOH, onde apesar de não haver diferença significativa, observa-se tendência de maior mineralização. A mineralização observada no grupo TEOS+KOH foi significativamente maior que nos grupos controle e T, não se diferenciando estatisticamente dos demais grupos, porém com tendência a maior produção mineral do que os grupos T+KOH e TEOS. A mineralização do grupo TEOS não se diferiu significativamente dos grupos Controle, T, T+KOH, apesar de mostrar tendência a maior mineralização do que o grupo T e

Controle. O grupo T+KOH apresentou, estatisticamente, maior mineralização do que o grupo o grupo T.

Ensaio de mineralizacao Vermelho de Alizarina - 21 dias



Ensaio Mineralizacao Vermelho de Alizarina - MC3T3 (triplicatas)
ANOVA - Tukey's multiple comparison test *p<0.05; **p<0.01;
***p<0.001

Figura 42 - Mineralização da matriz, corada por vermelho de alizarina (concentração do corante em µM) após 21 dias de cultura de osteoblastos nos grupos T, T+KOH, TEOS, TEOS+KOH e BIOV.

5.9 Imagens da morfologia celular e de nódulos de calcificação com respectiva análise química por EDS.

Imagens da morfologia de células osteoblásticas e de nódulos de calcificação foram realizadas por MEV após 7 e 14 dias de cultura celular, além da análise química dos nódulos, por EDS.

As imagens realizadas após 7 dias de cultura, em aumentos de 300, 600 e 1200X, mostraram similaridade entre os grupos com relação a concentração de células, espaçamento intercelular e morfologia poligonal das mesmas (FIGURAS 43, 46, 49, 52, 55). A partir de aumentos de 1200X, observa-se, em todos os grupos, a formação de alguns pequenos nódulos de calcificação, confirmados pela presença do pico de cálcio no mapeamento (FIGURAS 45, 48, 51, 54 e 57) e pelas imagens de EDS (FIGURAS 44, 47, 50, 53 e 56), porém o grupo BIOV se destaca com uma concentração um pouco maior, chamando a atenção para a formação de placas maiores de mineralização formadas sob as células, observadas nos aumentos de 5000 e 10000X (FIGURAS 55 E e F) e pelas imagens de EDS (FIGURA 56 A e B). Na análise do mapa de EDS observa-se sinais mais fortes para presença de cálcio nos

grupos T e BIOV e impossibilidade de se confirmar o fósforo pelo fato do seu sinal, ainda fraco, se confundir com o sinal do elemento ósmio, utilizado no preparo da amostra, pela proximidade do número atômico. Porém, analisando a composição química dos nódulos por imagens de EDS, podemos ver que os nódulos formados nos grupos T, T+KOH e TEOS (FIGURAS 44, 47 e 50) são exclusivamente de cálcio. Já os nódulos dos grupos TEOS+KOH e BIOV (FIGURAS 53 e 56) são formados por cálcio e fósforo.

Após 14 dias de cultura, no aumento de 300X, em todos grupos, praticamente não se observa espaçamento intercelular. Nessa magnificação, não se pode definir morfologia, pois o que se observa é uma camada ininterrupta de células (FIGURAS 58, 61, 64, 67 e 70). Ainda no aumento de 300X, observa-se uma massa celular compacta permeada por muitos nódulos de calcificação formando a matriz óssea extracelular. Nos maiores aumentos, 1200X, 2400X, 5000X e 10000X, não se vê grandes diferenças entre os grupos, observando sempre, muitos nódulos interlaçados por prolongamentos citoplasmáticos. Nas imagens de MEV, o grupo TEOS se diferencia pela grande presença de nódulos superficiais, ou seja, sobre a camada celular, com algumas células entremeadas (FIGURAS 64 A e B). Nas imagens de EDS, vê-se que todos os grupos apresentam na formação de seus nódulos os elementos químicos cálcio e fósforo em grande quantidade, porém, novamente, um destaque maior é para o grupo TEOS, pelo maior número de nódulos e pela forte presença de cálcio e fósforo (FIGURAS 59, 62, 65, 68, 71). Na análise do mapa de EDS, em todos os grupos, observa-se uma acentuação do pico de cálcio e a distinção do pico de fósforo em relação ao ósmio. O destaque é para os grupos TEOS e TEOS+KOH, que apresentaram os maiores picos de cálcio e fósforo (FIGURAS 60, 63, 66, 69 e 72).

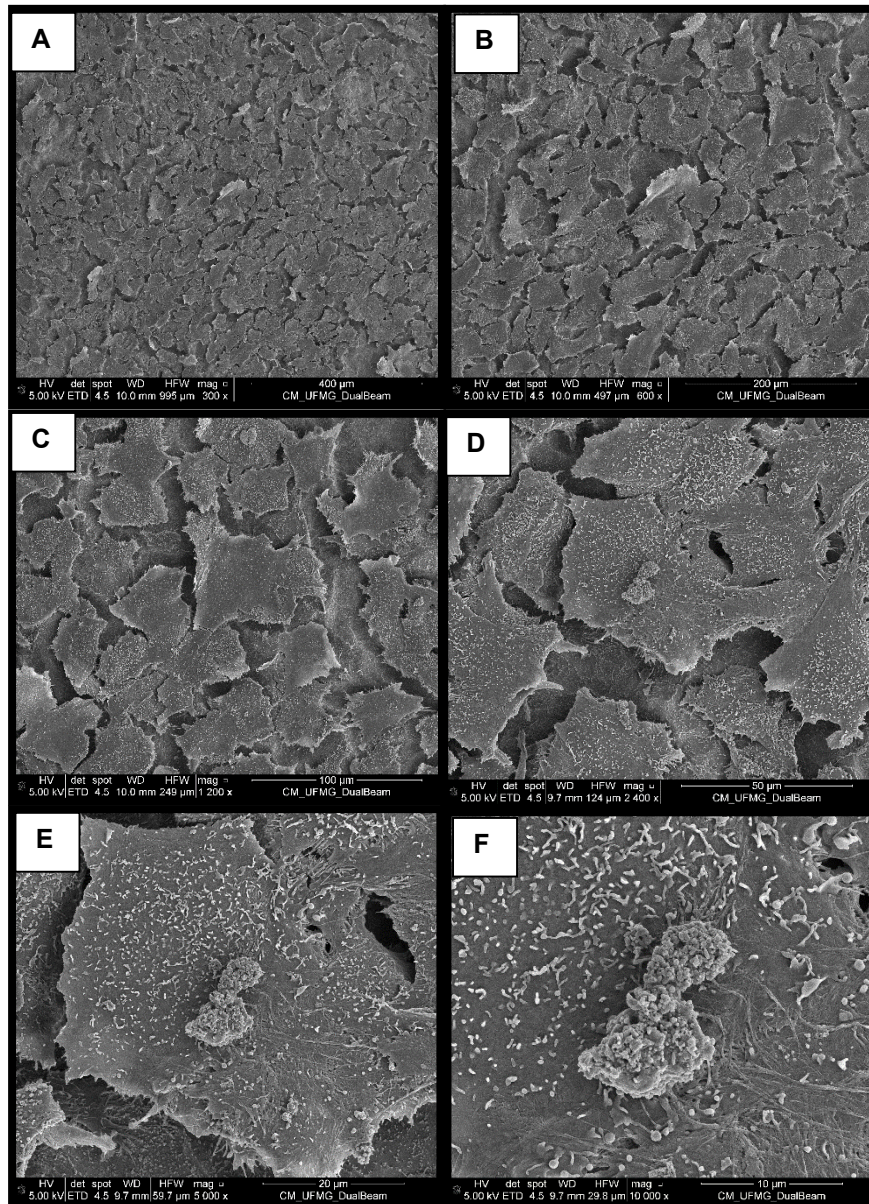


Figura 43 A, B, C, D, E, F- Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo I (T) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

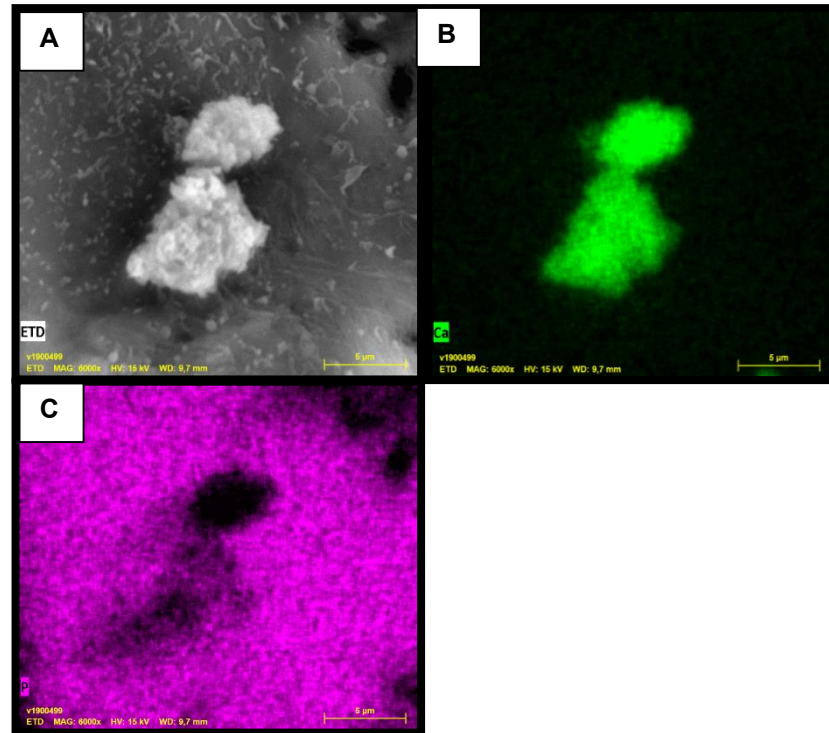


Figura 44 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo I).

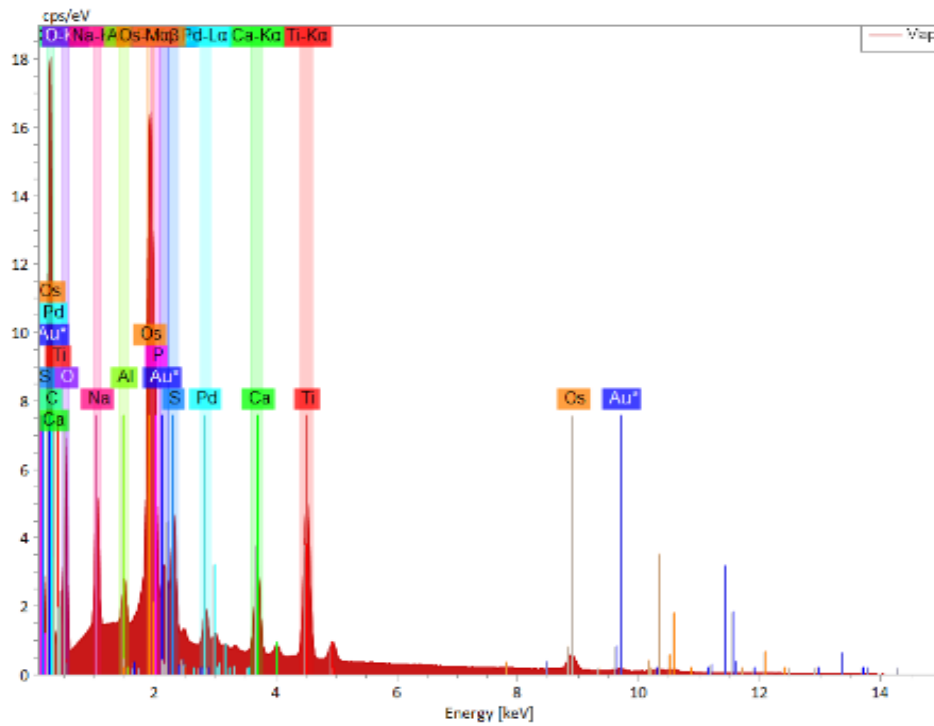


Figura 45 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo I (T).

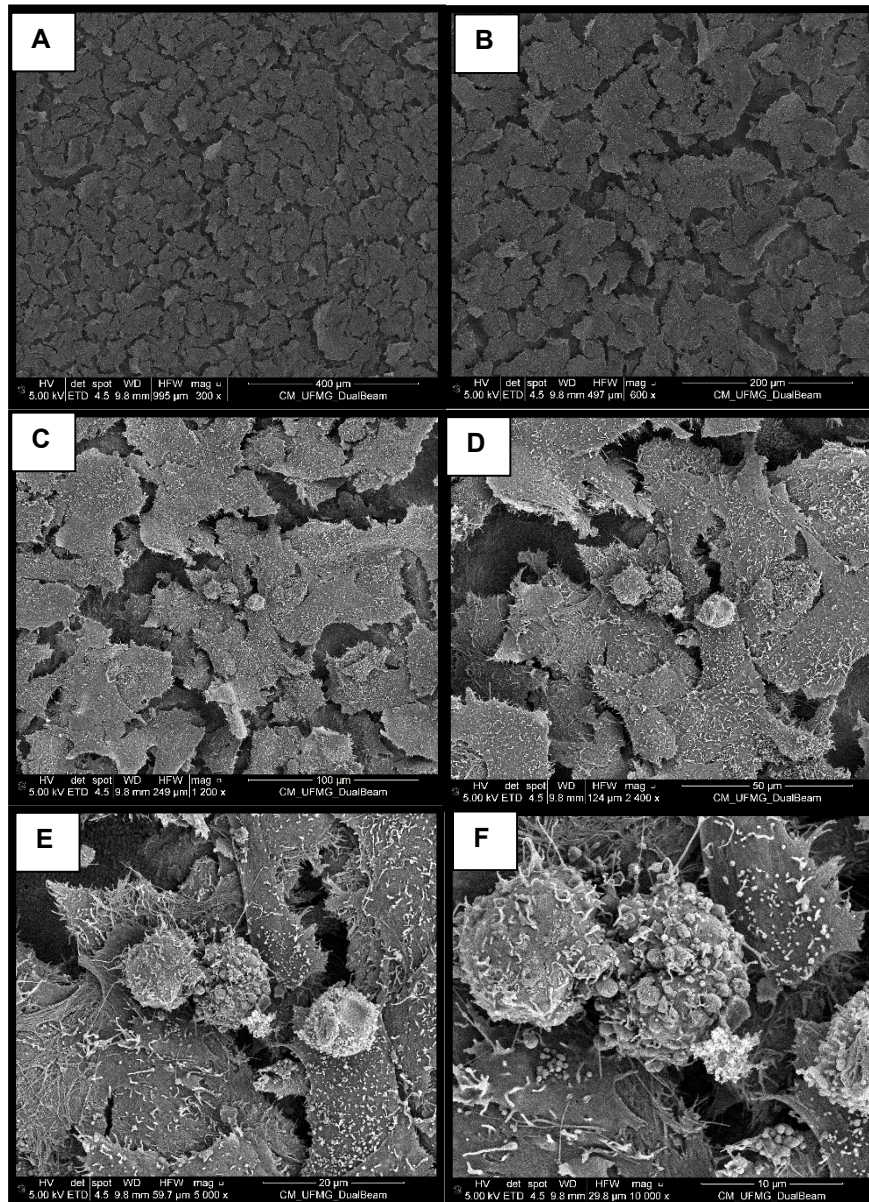


Figura 46 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo II (T+KOH) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

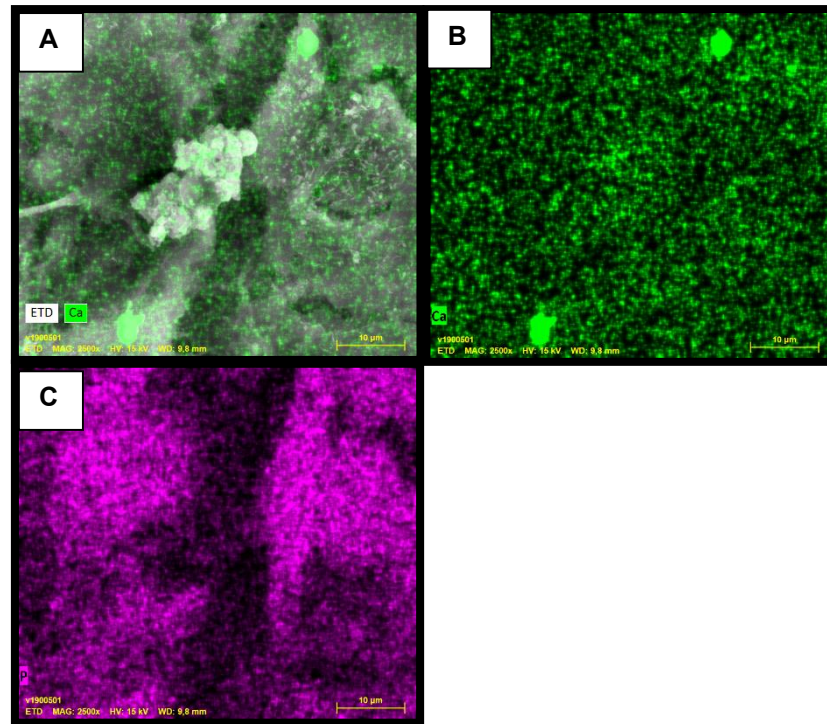


Figura 47 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo II).

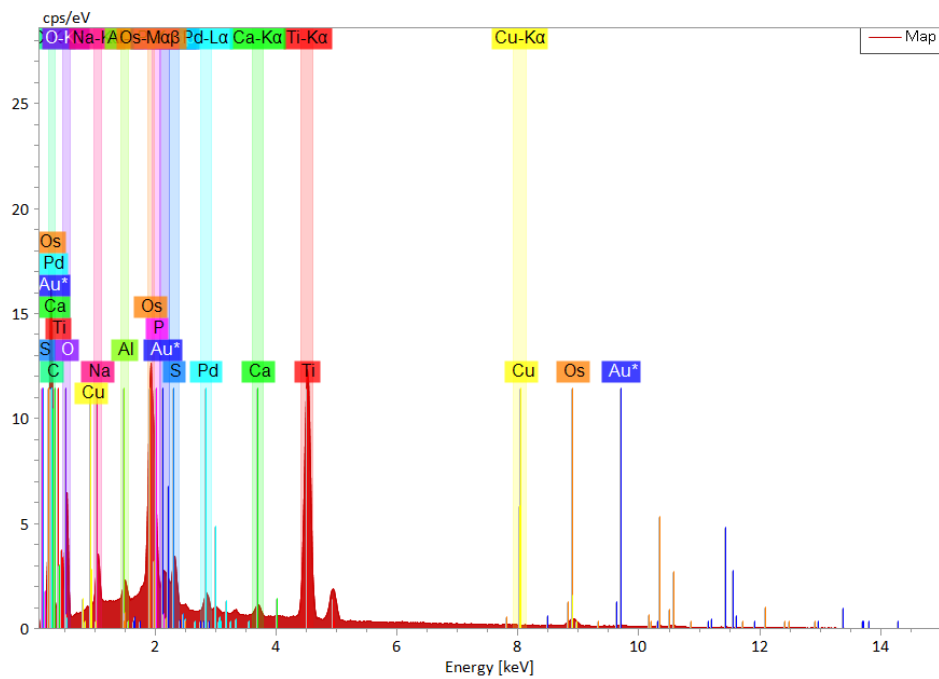


Figura 48 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo II (T+KOH).

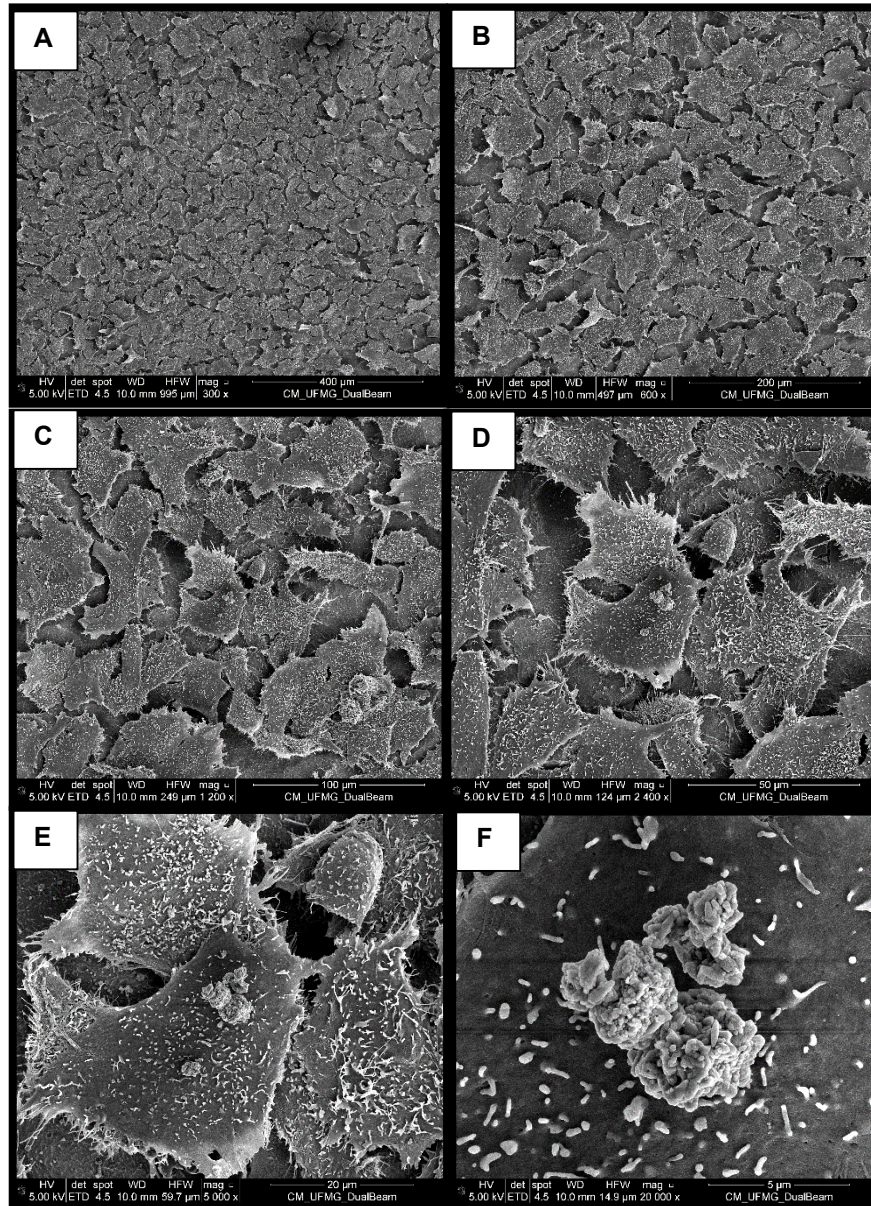


Figura 49 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo III (TEOS) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

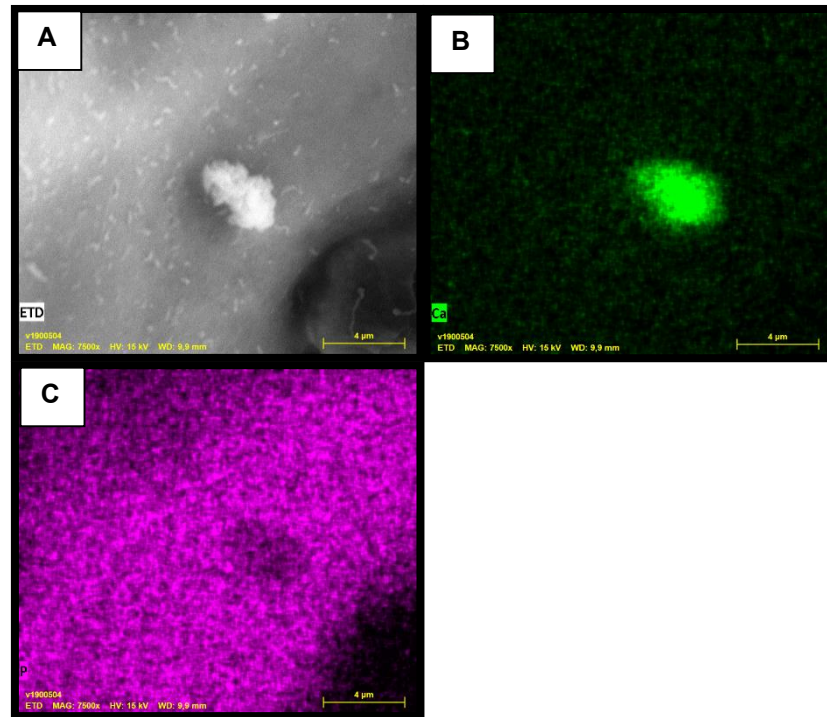


Figura 50 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo III).

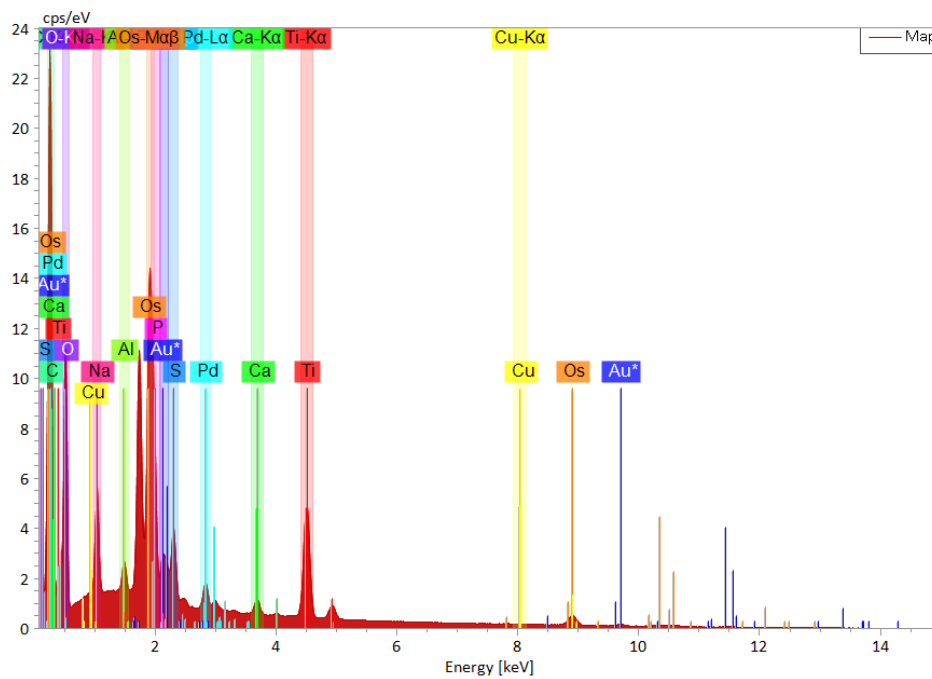


Figura 51 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo III (TEOS).

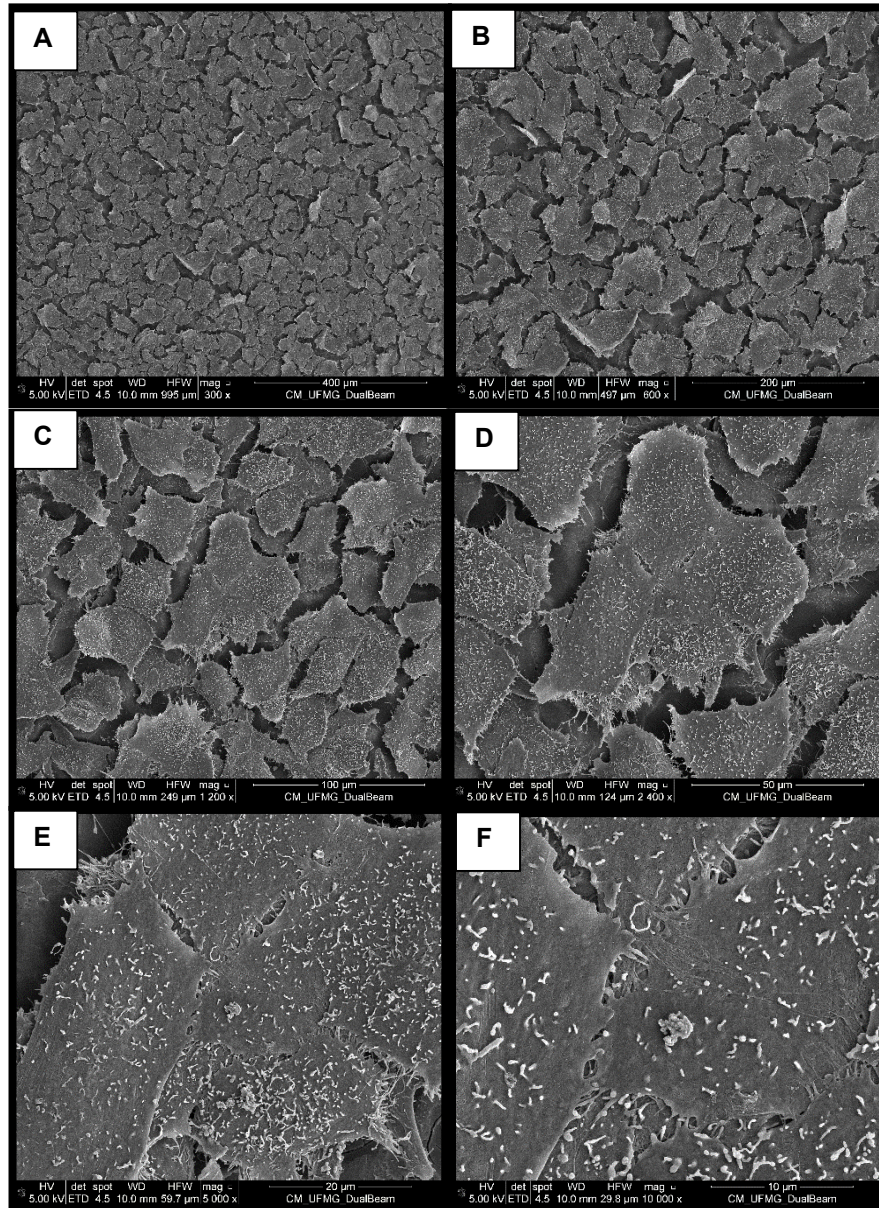


Figura 52 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo IV (TEOS+KOH) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

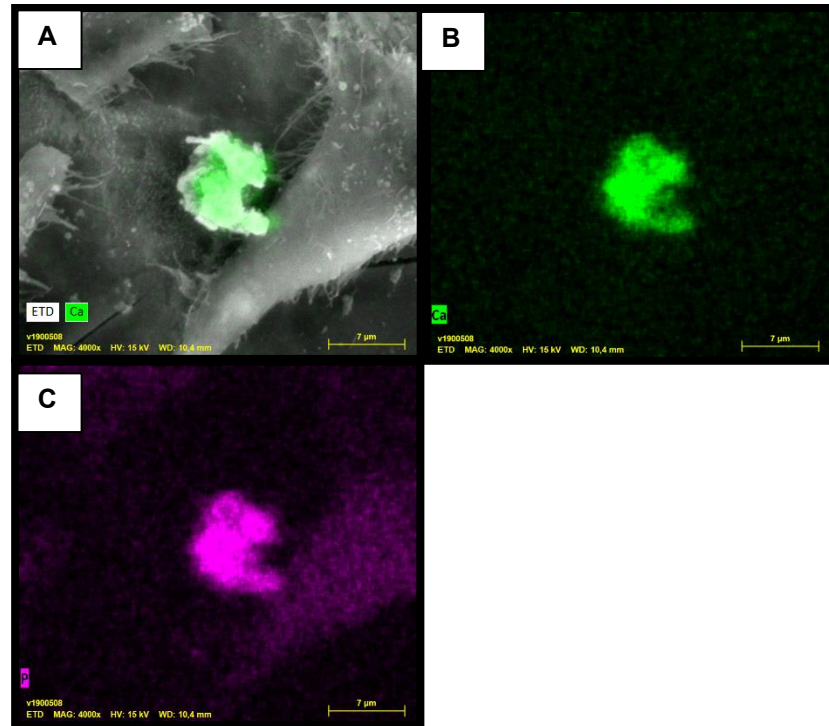


Figura 53 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo IV).

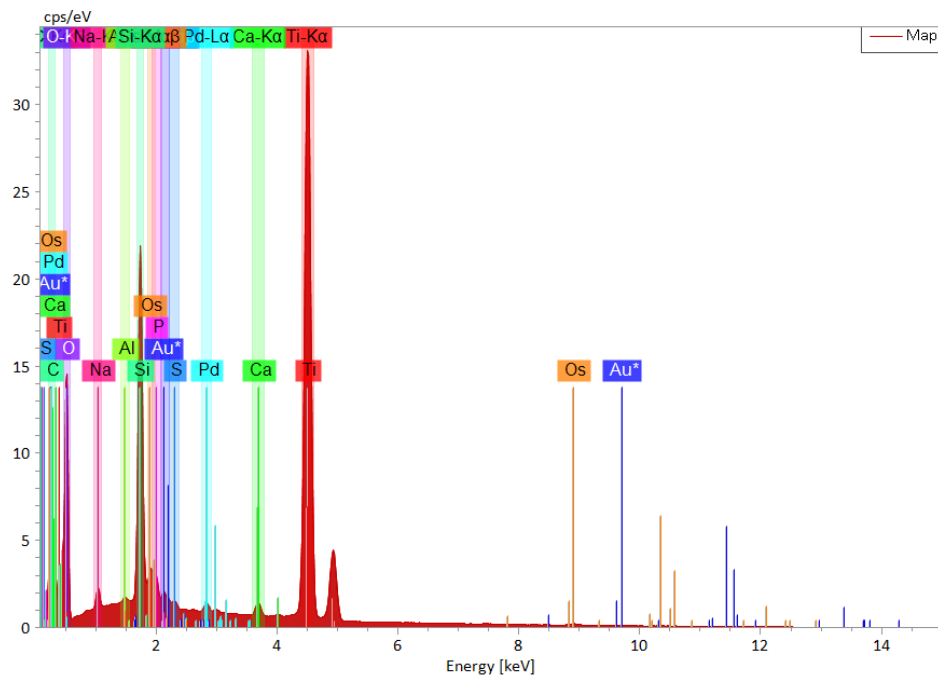


Figura 54 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo IV (TEOS+KOH).

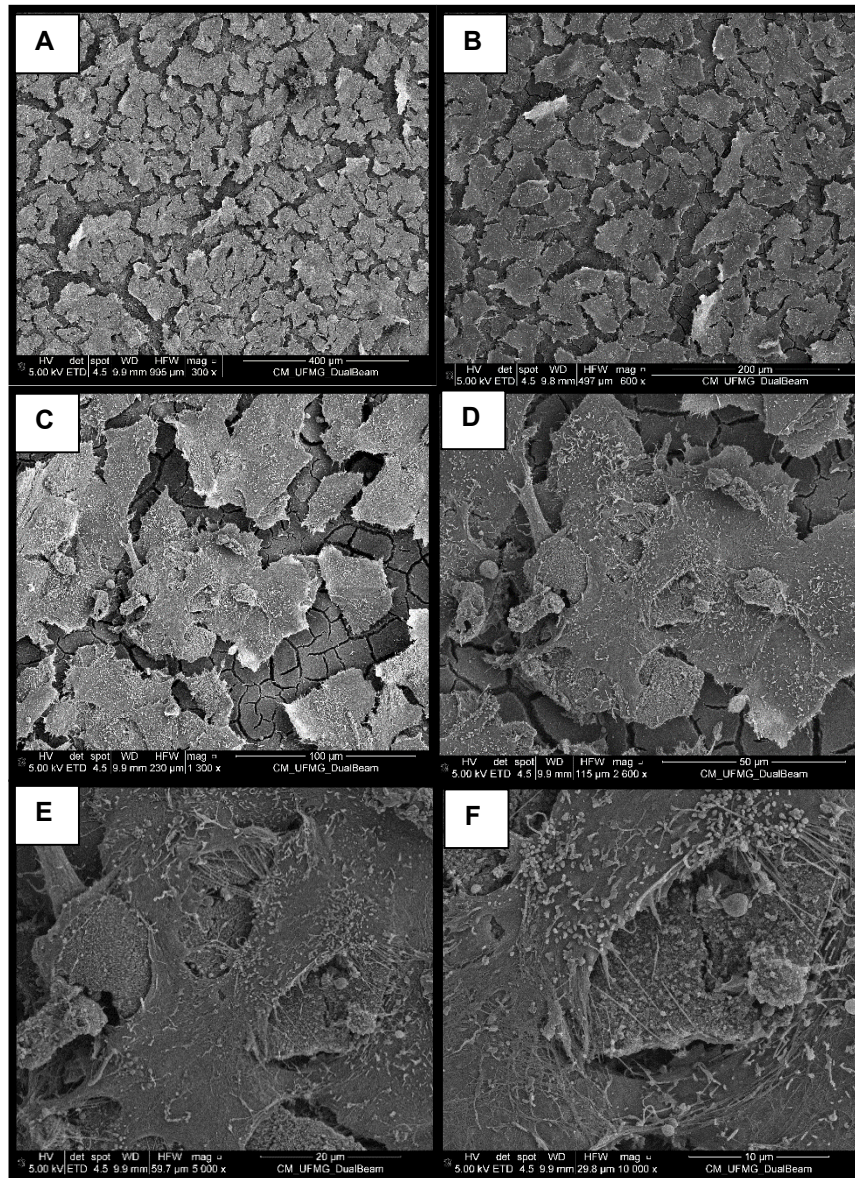


Figura 55 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 7 dias sobre a superfície das amostras do grupo V (BIOV) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1300X (C), 2600X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

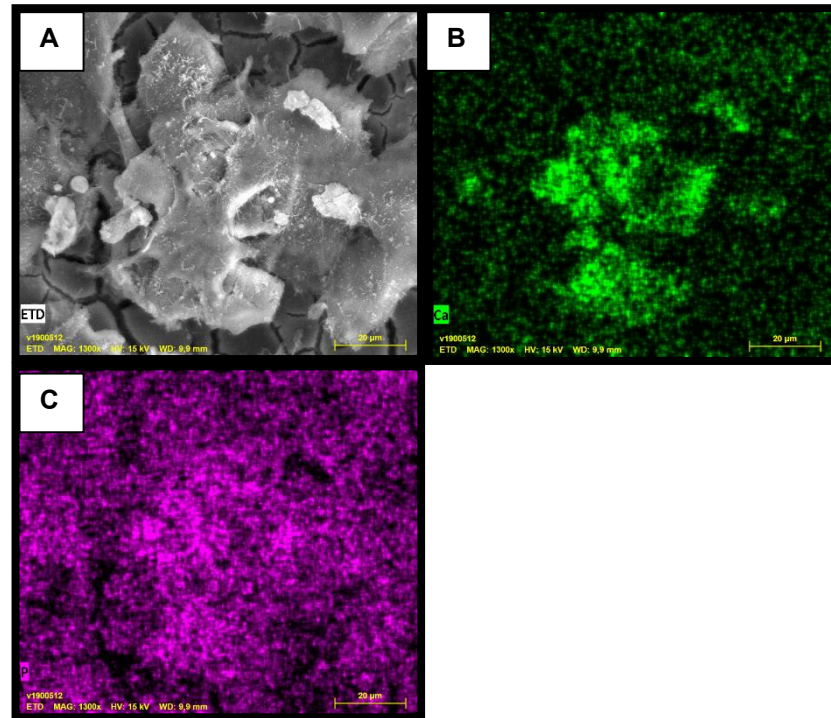


Figura 56 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo V).

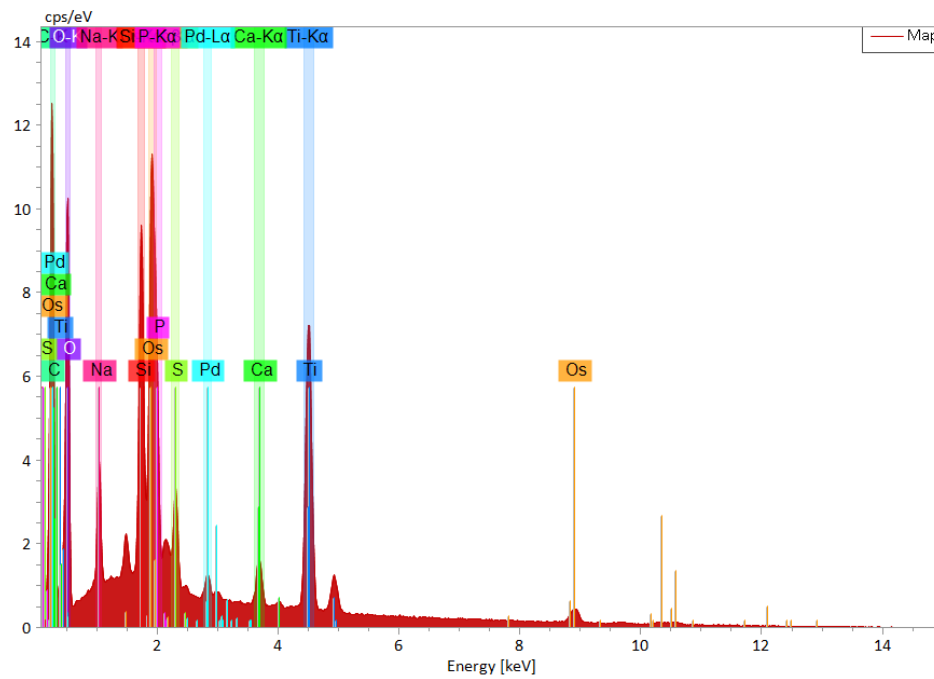


Figura 57 Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo V (BIOV).

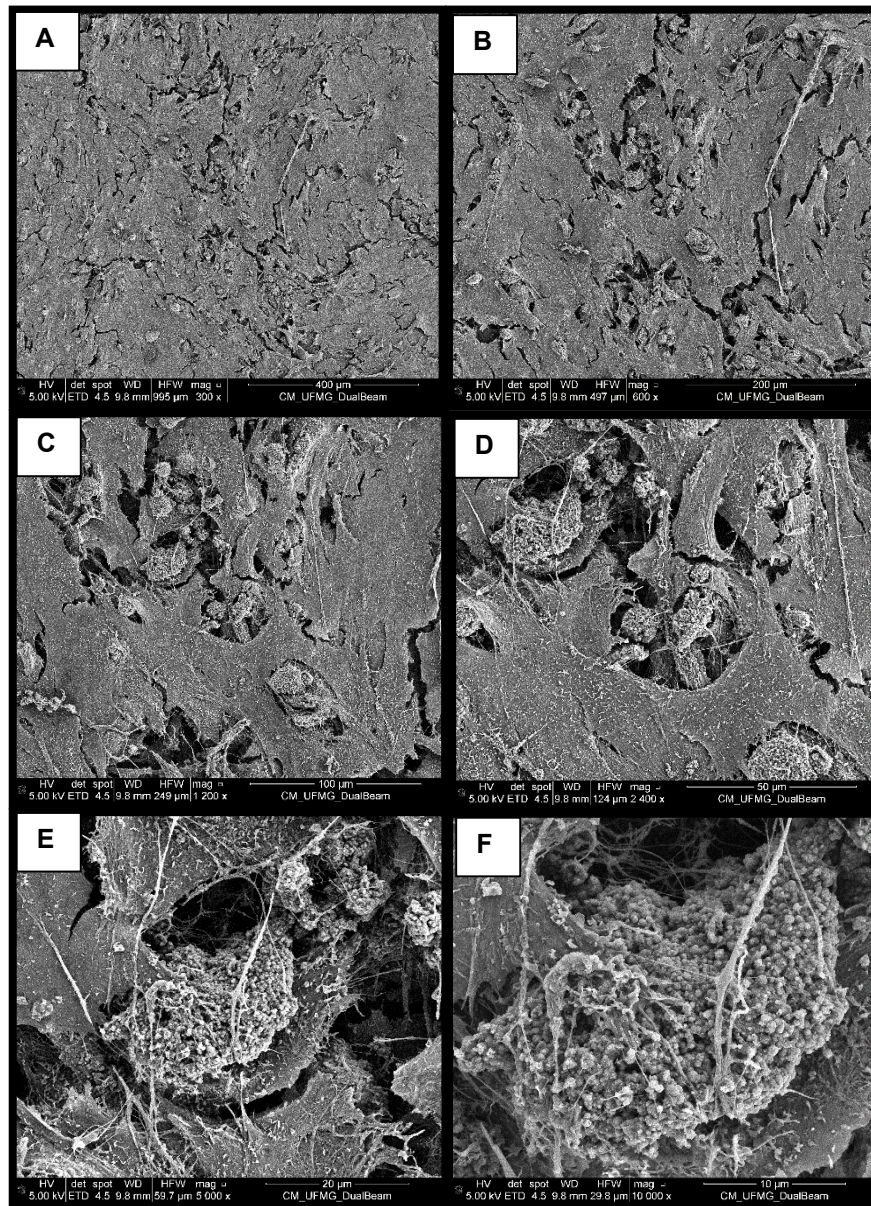


Figura 58 A, B, C, D, E, F- Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo I (T) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

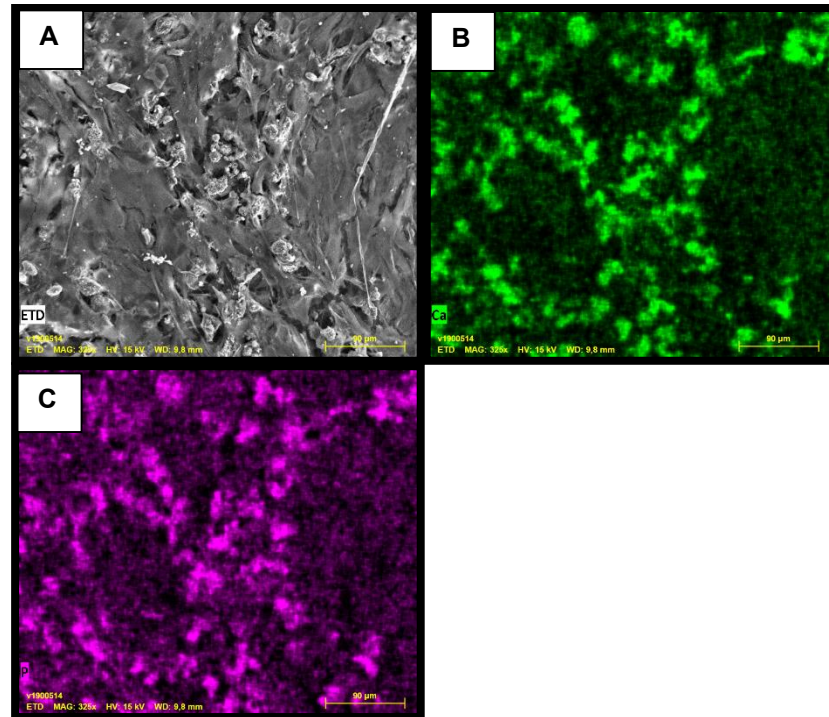


Figura 59 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo I).

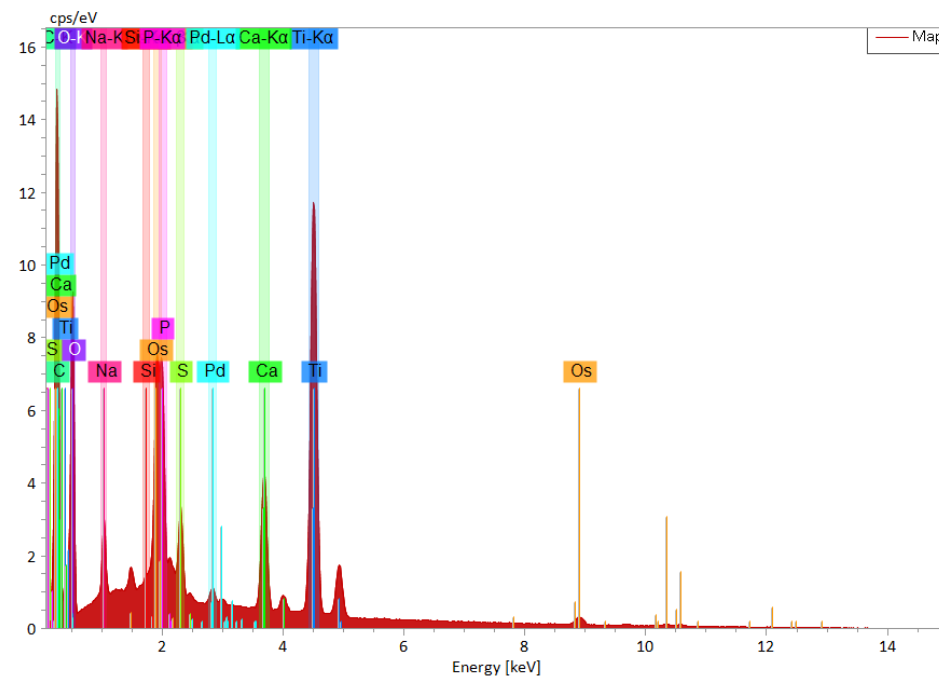


Figura 60 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo I (T).

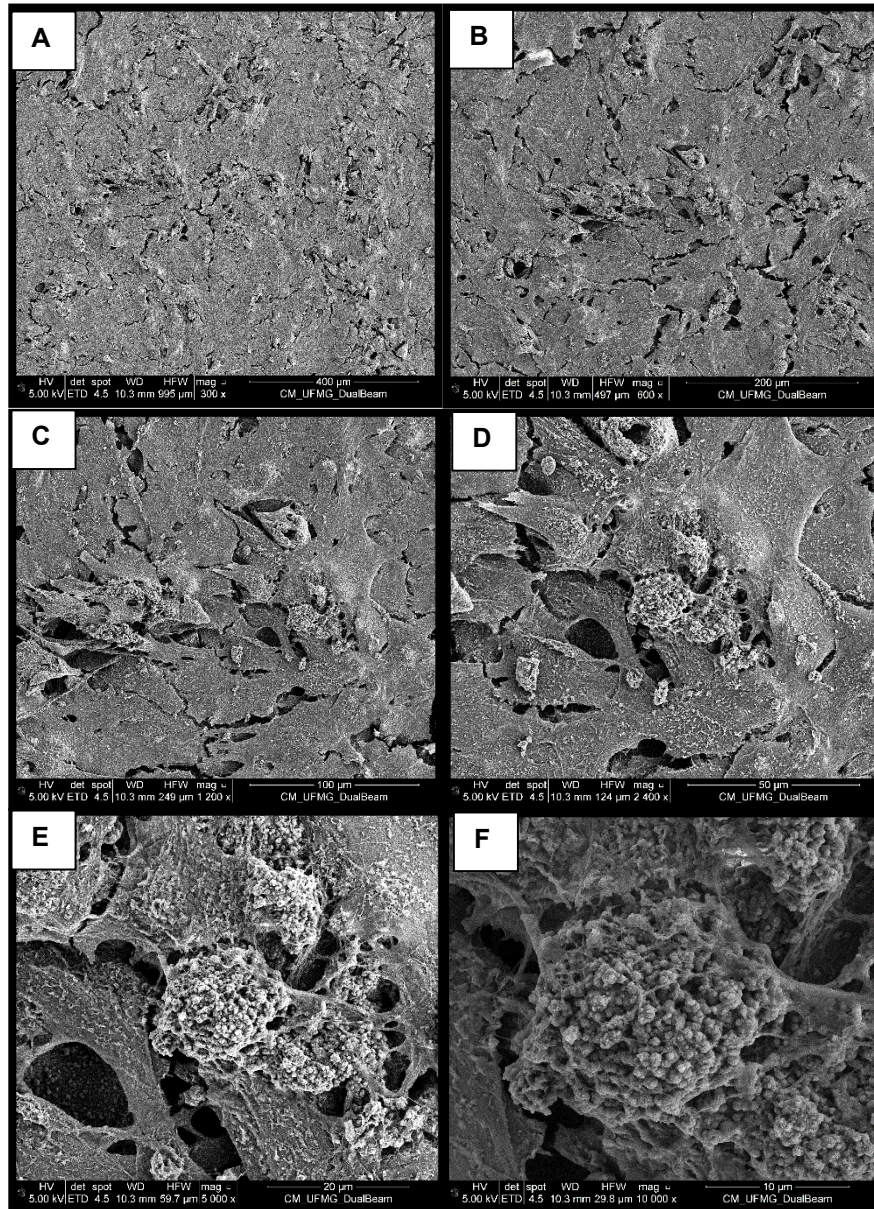


Figura 61 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo II (T+KOH) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

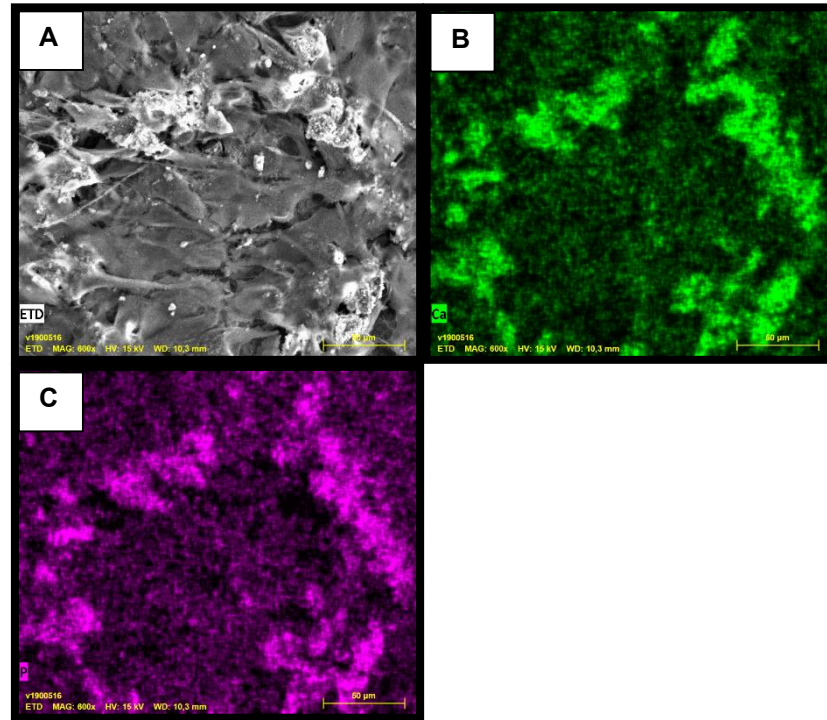


Figura 62 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo II).

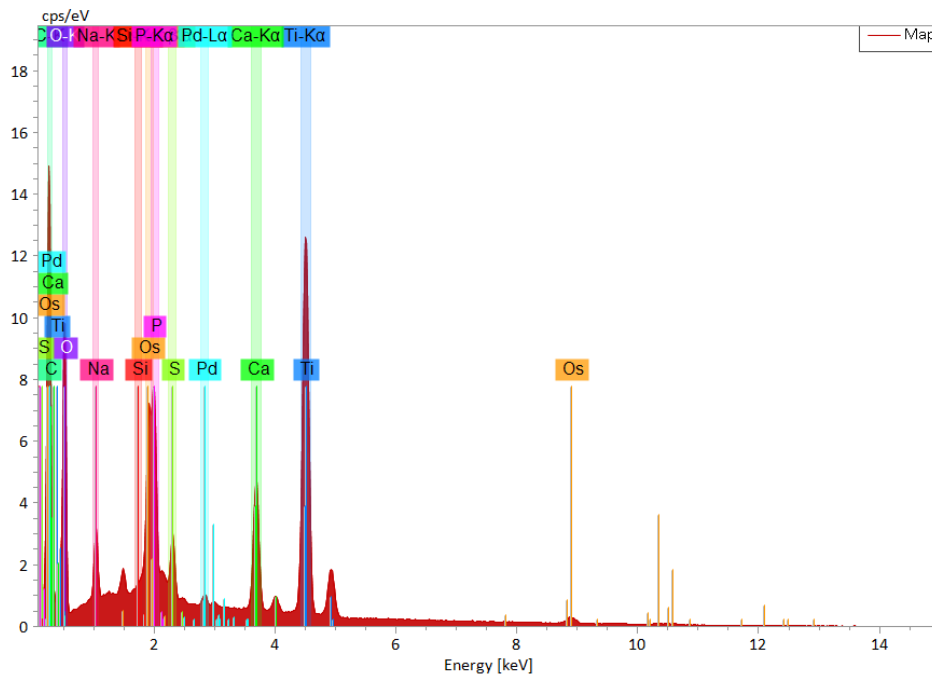


Figura 63 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo II (T+KOH).

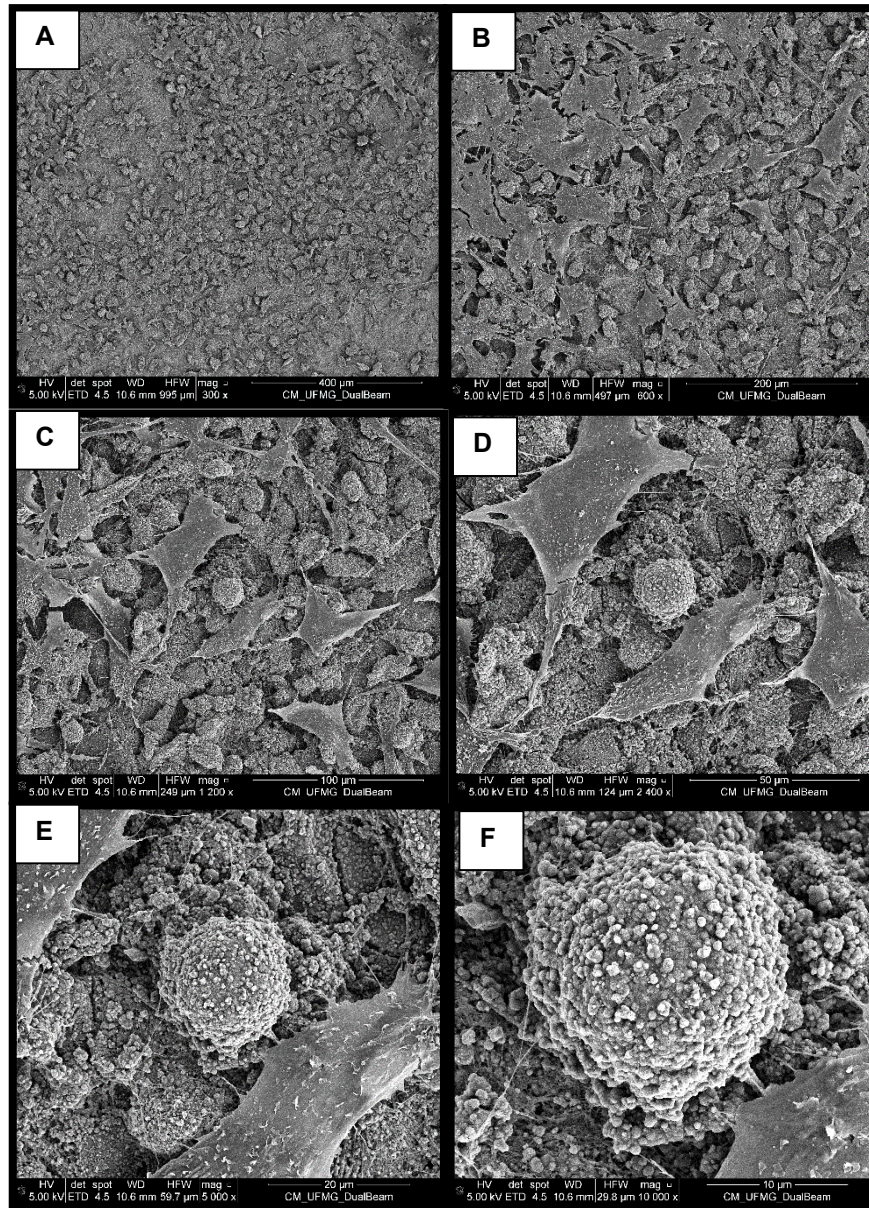


Figura 64 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo III (TEOS) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

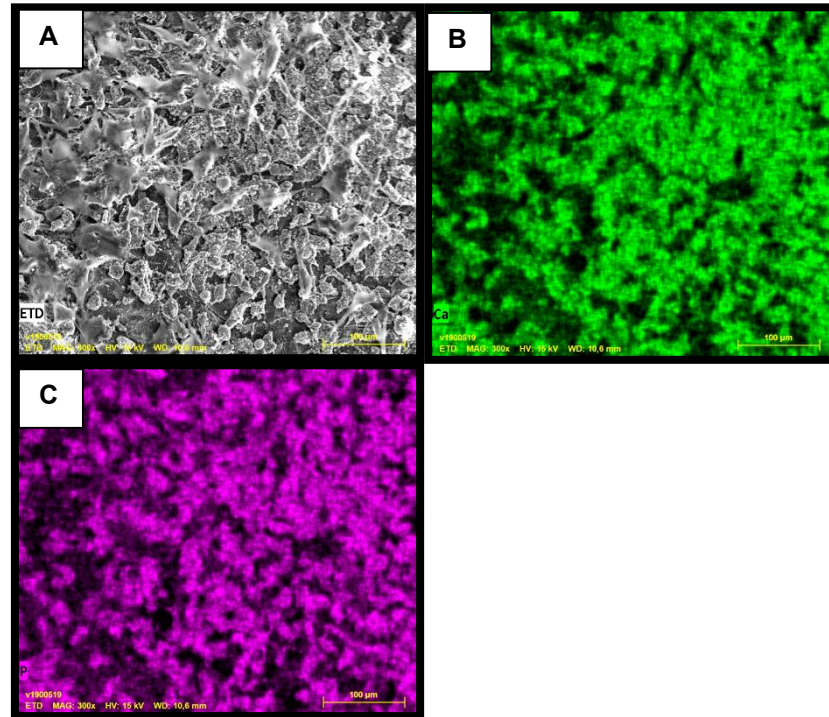


Figura 65 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo III).

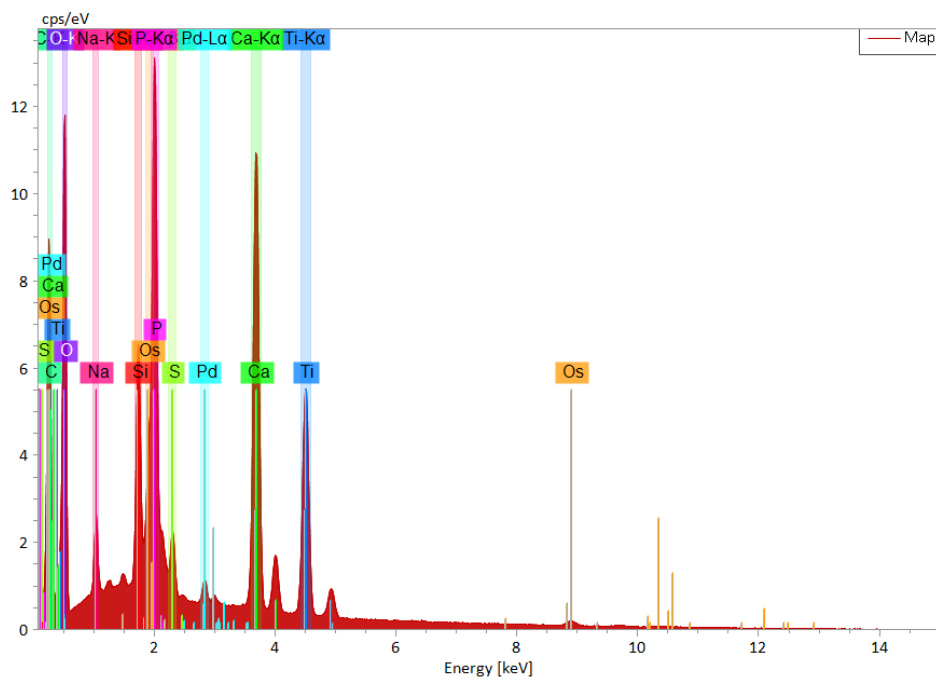


Figura 66 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na superfície das amostras do grupo III (TEOS).

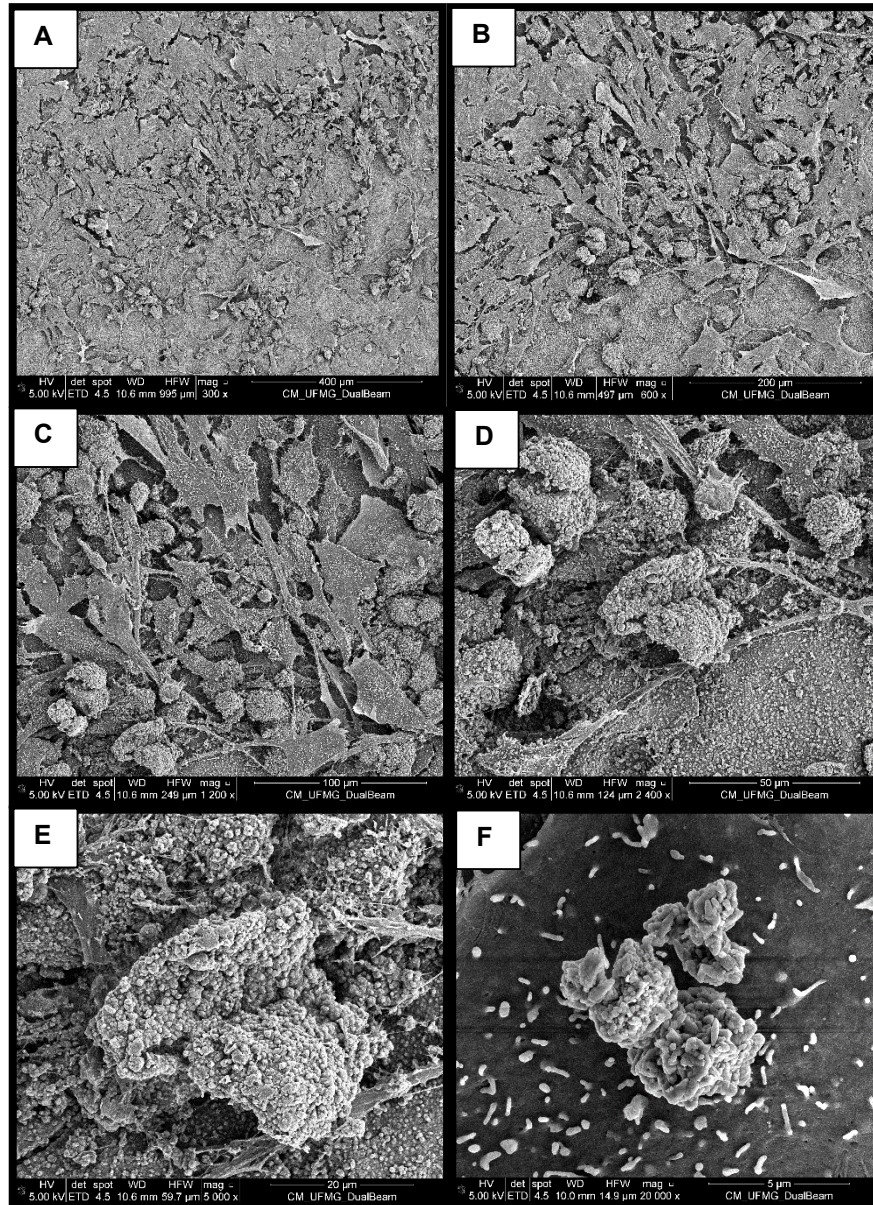


Figura 67 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo IV (TEOS+KOH) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

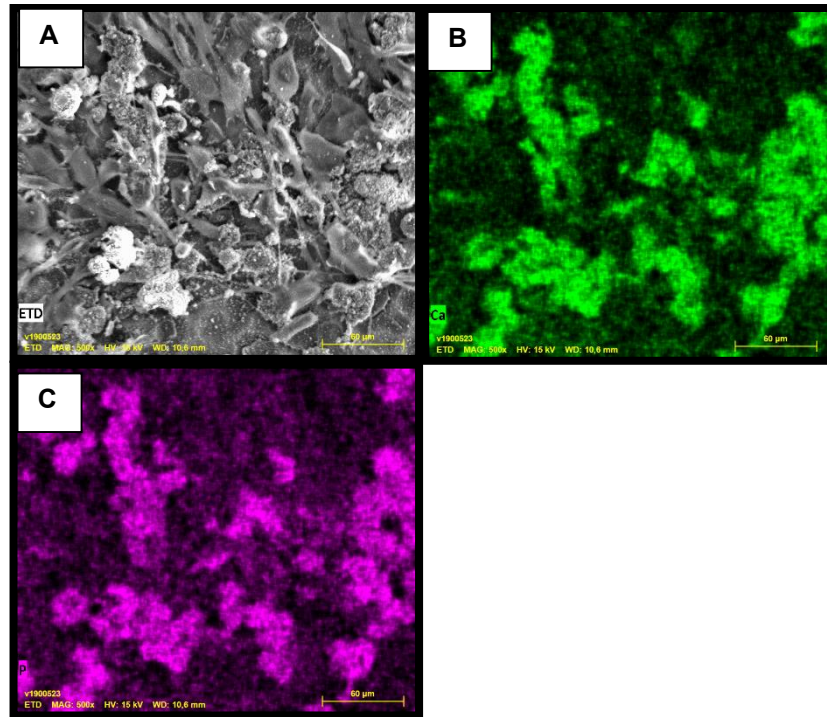


Figura 68 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo IV).

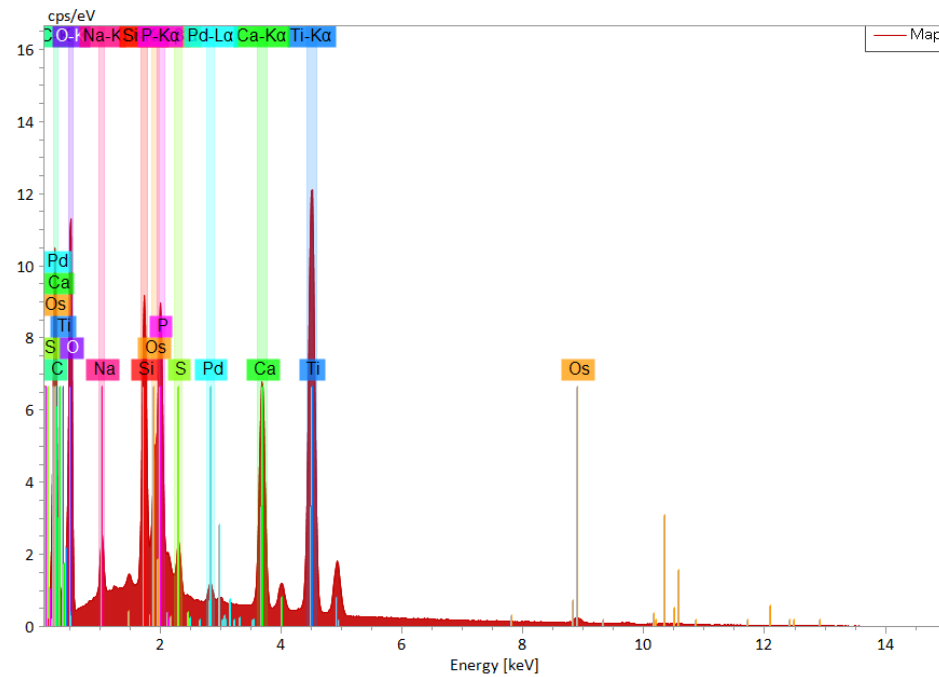


Figura 69 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo IV (TEOS+KOH)

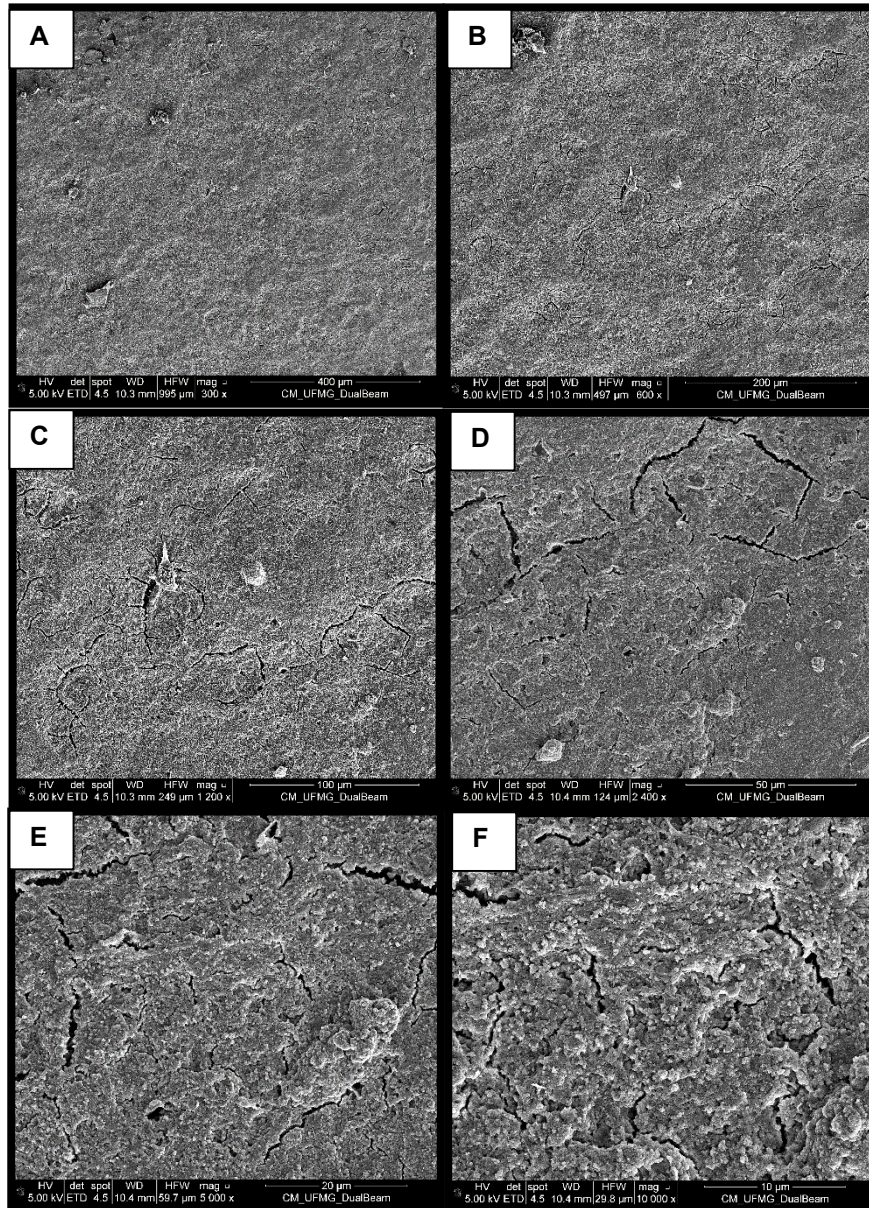


Figura 70 A, B, C, D, E, F - Imagens de osteoblastos cultivados por 14 dias sobre a superfície das amostras do grupo V (BIOV) e nódulos de calcificação sobre osteoblastos. Aumento de 300X (A), 600X (B), 1200X (C), 2400X (D), 5000X (E) e 10000X(F).

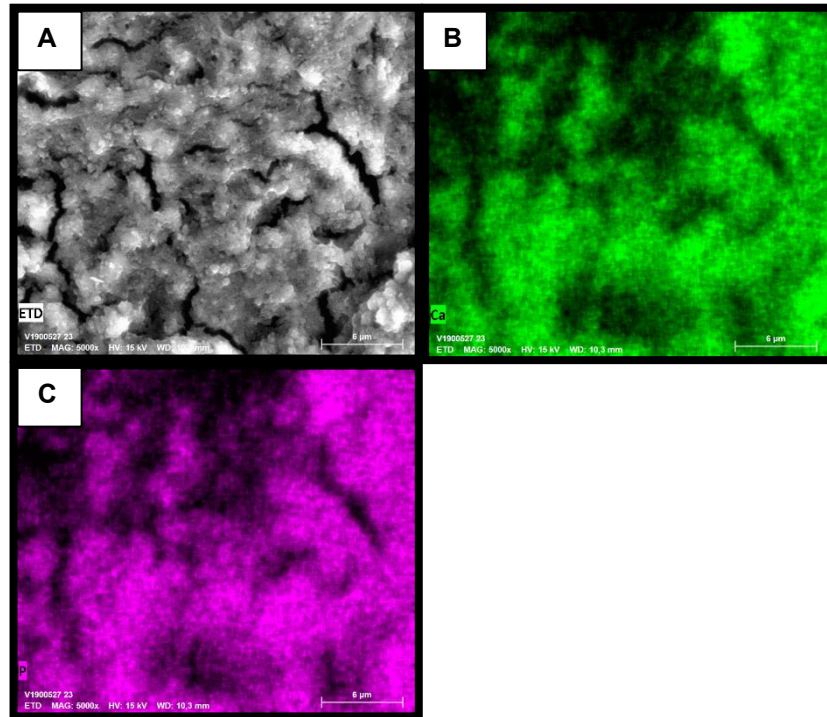


Figura 71 A, B e C – Imagens do mapeamento químico por EDS dos elementos Ca e P presentes nos nódulos (grupo V).

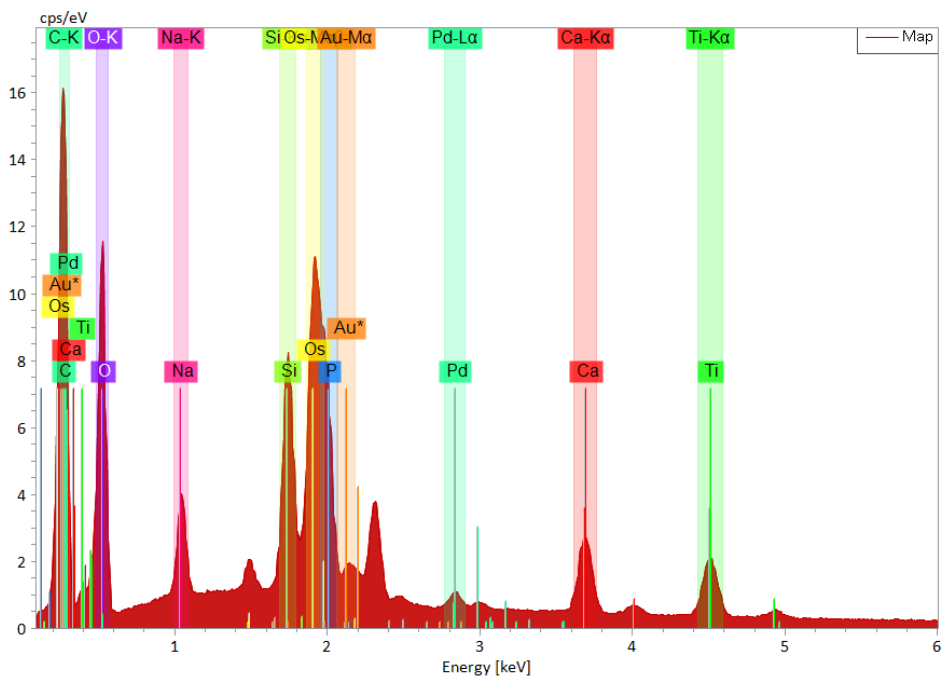


Figura 72 - Mapeamento dos elementos atômicos presentes na amostra do grupo V (BIOV).

6 DISCUSSÃO

A literatura mostra que os principais fatores que influenciam o desempenho das células ósseas no processo de osseointegração são a topografia de superfície, a molhabilidade e a composição química (ALFARSI, HAMLET and IVANOVISK, 2014; KOPF *et al.*, 2015). De acordo com pesquisas, como a revisão sistemática de Wennerberg e Albrektsson (2009), a rugosidade superficial é capaz de estimular a resposta de cicatrização óssea, tendo como melhores resultados, superfícies moderadamente rugosas ($1 < Sa < 2 \mu\text{m}$). Durante a produção da topografia de superfície do substrato de titânio (T), esse estudo buscou resultados próximos a rugosidade moderada ($\sim 2 \mu\text{m}$), porém um pouco além, pois de acordo com outros estudos (OIRSCHOT *et al.*, 2014), o recobrimento do substrato por vidro bioativo tornaria a superfície menos rugosa. No entanto, o resultado de rugosidade das amostras avaliado por meio do instrumento de perfilometria óptica 3D não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos, mantendo-se bem próximo da rugosidade moderada (FIGURAS 3a, 3b).

Superfícies com a mesma rugosidade podem apresentar respostas biológicas diferentes. Isso porque os diferentes métodos utilizados para se criar uma superfície moderadamente rugosa, produz, despropositadamente, alterações na nanotopografia e na composição química (WENNERBERG and ALBREKTSSON, 2009). Apesar dos grupos do presente estudo terem obtidos resultados semelhantes de microrrugosidade superficial, independentemente do tipo de revestimento aplicado sobre a superfície e suas particularidades químicas, as respostas biológicas já poderiam ser diferentes somente pelas alterações geradas na topografia nanométrica. Porém, esse estudo compara superfícies modificadas quimicamente, o que impossibilitaria fazer comparações isoladas da eficiência do aspecto topográfico entre os grupos. Na comparação de resultados entre pesquisas, a dificuldade de se comparar respostas biológicas geradas pelo fator rugosidade está em se isolar os fatores independentes e padronizar os parâmetros de avaliação, além disso, instrumentos são utilizados erroneamente na avaliação de nano e microtopografias. Por esses motivos, comparar a eficácia das superfícies pelo fator rugosidade traria resultados inconclusivos.

O objetivo de inserir todas as superfícies produzidas dentro de uma faixa de rugosidade moderada foi o de proporcionar os melhores estímulos biológicos.

Alguns estudos relatam que a velocidade e qualidade da osseointegração é influenciada pela textura do substrato (NOVAES *et al.* 2010). Além disso, de acordo com os estudos de Drnovsek *et al.* (2012), a impregnação de vidro bioativo no interior dos poros da superfície de titânio melhora significativamente a fixação óssea, pois induz o crescimento ósseo dentro dos poros, diferentemente das superfícies de titânio sem vidro bioativo.

Outros aspectos microestruturais da superfície também devem ser levados em consideração. Nesse estudo, os revestimentos de vidro bioativo foram processados pela rota solgel, por duas diferentes vias, hidrólise e condensação de precursor químico alcóxido (TEOS), e gelificação de suspensão coloidal. Ambas resultaram em coberturas de vidro bioativo com presença de trincas causadas por motivos diferentes.

No processo tradicional de rota de fusão do vidro bioativo em altas temperaturas sobre a superfície de titânio, o coeficiente de expansão térmica do vidro deve coincidir com o do metal para evitar que o vidro trinque e se descole da superfície durante o processamento. Alguns trabalhos, como o de Jones (2012), buscaram adequar o coeficiente de expansão térmica pela alteração da composição química da rede de vidro. A substituição do Na_2O por K_2O e do CaO pelo MgO foi a chave para adequar a expansão. Porém, essa composição é uma linha tênue entre a bioatividade e bioinércia.

O diferencial da síntese dos vidros bioativos pela rota solgel nesse estudo passa por reações poliméricas de compostos precursores à temperatura ambiente para formar um gel que se transforma em rede de vidro em baixas temperaturas, não passando pelo processo de sinterização. Apesar disso, existem outras causas na formação das trincas pelo processo solgel, que não seja a temperatura de sinterização.

O vidro bioativo sintetizado via precursor químico TEOS passa pela formação de um gel úmido devido ao excesso de água dos reagentes e ao álcool e água resultantes do processo de reação de hidrólise e condensação. Como a água e o álcool evaporam durante a secagem, eles deixam uma rede de poros que trincam por causa da contração que ocorre durante a secagem e evaporação dos subprodutos líquidos da reação de condensação. Quando o líquido dos poros é removido dos géis, o vapor viaja de dentro do gel para a superfície através da rede de poros

interconectados. Isso pode causar estresse capilar dentro da rede de poros e, portanto, craqueamento.

O vidro bioativo sintetizado via gelificação de suspensão coloidal não apresenta na sua síntese evaporação de subprodutos de reação de condensação e hidrólise, porém apresentaram trincas causadas, provavelmente, pela grande espessura do revestimento, que se apresentou de 10 a 100 vezes maior que as demais coberturas. Esses resultados corroboram com o estudo de Valliant (2012), o qual relata que sistema coloidal resulta em estruturas de escalas sub micrométricas, enquanto o sistema alcóxido exibe estruturas em escalas nanométricas.

Nos grupos TEOS e TEOS+KOH, observamos no momento inicial, antes do contato com a solução osteogênica de cultura celular, a formação de trincas no formato de microplacas que pareceram desaderir do substrato de titânio. O aspecto das trincas permaneceu inalterado após avaliação de 7 dias de cultura celular, o que nos leva a crer que o ataque aquoso à rede de Si-O não colaborou para o aumento das rachaduras.

No grupo BIOV, as trincas avaliadas antes do contato aquoso mostravam-se descontínuas sem formação de placas (FIGURA 9 D). Porém, após 7 dias de contato com solução de meio osteogênico, as trincas aumentaram e se uniram em formato de quarteirões (FIGURA 67 C e D). Mas pelo fato do revestimento ser mais espesso, não aparentou descolamento ao substrato de titânio. Os resultados corroboram com o estudo de Bloyer *et al.* (2007), que relata que o ataque aquoso à rede de Si-O do vidro parece ser o mecanismo dominante no crescimento da trinca nesses vidros bioativos. O aumento das trincas foram controladas pela reatividade química, onde os resultados sugerem que o aumento da bioatividade nas regiões de fissuras, gerou o crescimento dessas.

Os estudos de Xynos *et al.* (2001), Carvalho *et al.*, 2009, Hench (2006), ao evidenciarem a associação entre dissolução iônica dos vidros bioativos e atividade celular, corroboram com os resultados dessa pesquisa. Apesar do aparecimento de trincas nas coberturas de vidros bioativos, o crescimento celular não foi perturbado após 7 ou 14 dias de avaliação morfológica, e se mostrou similar e até mesmo maior em relação as superfícies que não receberam cobertura de vidro bioativo, provavelmente porque as trincas e o aumento delas esteja relacionado a dissolução iônica de vidros bioativos e ao efeito direto sobre a expressão gênica de osteoblastos.

A análises de EDS e de EELS feitos pelo MET revelaram a presença predominante de Ti na superfície do substrato nas amostras de T e T+KOH. Sinais de Si também apareceram nas análises de MET, não sendo detectados pelo MEV, o que sugere contaminação superficial da amostra em alguma fase de preparação do substrato.

Na análise de lamelas realizada pelo MET, os grupos TEOS, TEOS+KOH e BIOV apresentaram fortes picos de Si em regiões exclusivas de recobrimento, com ausência de Ti. Na análise mais profunda, após o perfil do revestimento, o Ti passou a ser o elemento predominante, com ausência de Si. A presença de Si nos revestimentos era esperado por ser o principal elemento químico que compõe a rede de vidro.

Os grupos que receberam deposição do composto químico hidróxido de potássio, T+KOH e TEOS+KOH, não apresentaram sinais de presença de potássio nas análise de EDS ou EELS, provavelmente pela baixa concentração sobre a superfície. A única constatação da presença do composto básico pôde ser feita pela visualização de precipitados cúbicos nas imagens de MEV (FIGURAS 5C, 5D).

A adição de hidróxido de potássio (KOH) à superfície de Titânio e TEOS mostrou melhores resultados de mineralização do que os respectivos grupos sem KOH. Segundo os trabalhos de Jones (2012), a dissociação iônica do KOH com consequente liberação do grupo OH^- leva ao ataque das ligações de sílica do vidro Si-O-Si, favorecendo a formação de silanol (SiOH) e deposição dos grupos Ca^{+2} e PO_4^{-3} na superfície. Esse trabalho também corrobora com os estudos de Li *et al.* (1994) que mostraram que em superfícies carregadas negativamente, como sílica e titânio, ocorreu precipitação de HCA, sendo que o mesmo não aconteceu para superfícies positivas, como as de alumina. Uma das causas estaria na densidade de grupos silanol (SiOH) e na velocidade que o substrato seria hidrolisado e dissolvido para que houvesse liberação de SiOH na sua superfície. Claramente, a formação da apatita está associada com superfícies carregadas negativamente, assim como a abundância de grupos OH liberados em solução.

O grupo BIOV apresentou sinais de Ca, Cl e Si na região do revestimento e Ti na região do substrato. O elemento P presente no precursor químico ácido fosfórico (H_3PO_4) não foi incorporado a rede de vidro. Os sinais de Cl e Ca vieram do precursor químico CaCl_2 .

As análises de XPS reafirmaram a presença de contaminação por Si nas amostras dos grupos T e T+KOH. No grupo T, estima-se que cerca de 40% da amostra é composta por TiO_2 , 40% de SiO_2 (ou alguma fase SiO_x) e 20% da superfície da amostra é formada pela fase Ti_2O_3 . No grupo T+KOH, estima-se que cerca de 17% da amostra é composta por SiO_2 ou alguma fase intermediária SiO_x , 1% da superfície da amostra é formada por carbeto de silício, 42% da superfície da amostra é formada pela fase TiO_2 , menos de 4% pela fase Ti_2O_3 .

No grupo TEOS e TEOS+KOH, a maior concentração é do composto dióxido de silício (SiO_2), esperado por ser o principal componente do vidro bioativo. No grupo TEOS, estima-se que cerca de 77% da amostra é composta por SiO_2 (ou alguma fase SiO_x), 12% da superfície da amostra é formada por TiO_2 e Ti_2O_3 . No grupo TEOS+KOH, estima-se que cerca de 58% da amostra é composta por SiO_2 (ou alguma fase intermediária SiO_x), 10% da superfície da amostra é formada pela fase TiO_2 , 12% pela fase Ti_2O_3 .

Assim como no EDS, a análise de XPS não constatou a presença do composto KOH, presente na solução em que as amostras dos grupos T+KOH e TEOS+KOH foram imersas.

No grupo BIOV, estima-se que cerca de 53% da amostra é composta por SiO_2 (ou alguma fase SiO_x), 22% da superfície da amostra é formada por TiO_2 juntamente com a fase Ti_2O_3). Observa-se também a presença de $CaCl_2$. Porém, não se constatou a presença de P se ligando a nenhum elemento químico, deixando evidente que o precursor químico ácido fosfórico não foi incorporado a rede de vidro.

Os resultados dos testes de hidrofiliabilidade de superfície mostraram maior molhabilidade para a superfície de vidro bioativo do grupo BIOV ($P < 0,05$). Essa maior hidrofiliabilidade pode estar associada à maior solubilidade observada, até mesmo, durante os ensaios de cultura celular, onde a adição de meio osteogênico sobre os discos resultou em uma alteração visível na coloração da solução de meio em relação aos demais grupos, sugerindo uma rápida solubilização da cobertura de vidro.

As pesquisas de Wilson *et al.* (1981) e Foppiano *et al.* (2004) avaliaram a toxicidade e biocompatibilidade de vidros bioativos e concluíram que esses podem ser considerados citocompatíveis por não possuírem efeitos significativamente negativos, substâncias lixiviáveis que produzem processo inflamatório e por não impedirem crescimento e divisões em cultura celular. Corroborando com os estudos de Wilson *et al.* (1981) e Foppiano *et al.* (2004), os resultados de Carvalho *et al.* (2009) em análise

de MTT por 72 horas mostraram um aumento da viabilidade celular para cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos em contato com produtos da dissolução iônica do vidro bioativo com 60% de sílica (BG60S). Esse estudo apresenta resultados compatíveis aos trabalhos de Wilson *et al.* (1981) e Foppiano *et al.* (2004) por não apresentarem citotoxicidade nos produtos iônicos dos vidros bioativos quando em contato com as células, porém não corroboraram com os resultados de Carvalho *et al.* (2009), por não ter apresentado viabilidade celular significativamente maior para os recobrimentos de vidro bioativo quando comparado aos grupos T e T+KOH, sem cobertura. Além disso, todos os grupos apresentaram, estatisticamente, menor viabilidade celular do que o grupo controle (sem discos), resultados que corroboram com os estudos de Lavos-Valereto (2002) e apontam uma menor viabilidade simplesmente pela presença dos discos.

O controle das dosagens de dissolução iônica é importante pois o excesso de íons pode ser tóxico para as células. A expressão dos genes é dose dependente, com a mais alta expressão de gene observada na concentração de $20\mu\text{g ml}^{-1}$ de sílica solúvel e de $60\text{-}90\mu\text{g ml}^{-1}$ de íons cálcio (Hench, 2009). De acordo com os estudos de Maeno *et al.* (2005), a concentração de íons Ca^{+2} em contato com osteoblastos apresenta uma faixa de valores que se relacionam a sobrevivência, diferenciação ou apoptose de células osteoblásticas. Hench (2009) relata que a velocidade de dissolução e liberação iônica não pode ser nem tão alta a ponto de não ser efetiva, nem tão baixa a ponto de não estimular a diferenciação e proliferação celular. Nesse estudo, a ausência de diferença estatística, entre os grupos, durante os ensaios de MTT 24 horas e 7 dias (FIGURA 41), sugere não haver efeito negativo da velocidade de solubilização do vidro bioativo dos grupos TEOS, TEOS+KOH e BIOV para a viabilidade celular.

Os resultados positivos em relação ao ensaio de mineralização (FIGURA 42) sugere uma dissolução iônica favorável aos estímulos genéticos celulares para mineralização da matriz óssea pelos osteoblastos, podendo ser comprovado pela diferença estatisticamente significativa em relação a maior produção mineral pelos grupos TEOS+KOH e BIOV quando comparado aos demais grupos. Os melhores resultados para o grupo BIOV corrobora com o estudo de Anitua *et al.* (2015) que atribui a melhora dos parâmetros de mineralização à presença de íons cálcio.

As análises de morfologia celular de 7 dias feitas por imagens de MEV mostram aspectos compatíveis aos resultados de ensaios de MTT (7dias). Pelas

imagens, não se observa diferença nos grupos em relação ao povoamento celular, distância entre células, morfologia e aderência, o que nos remete aos resultados de indiferença estatística para a viabilidade celular.

Em relação a produção de nódulos de mineralização visualizadas pelo MEV e EDS, observa-se uma condição diferenciada para os grupos TEOS+KOH e BIOV no período de 7 dias. Isso porque a análise química por EDS mostrou que exclusivamente nesses grupos, os nódulos formados apresentavam cálcio e fósforo em sua composição. É provável que a produção de fósforo livre pela atividade enzimática de fosfatase alcalina tenha acontecido precocemente nos dois grupos.

Associado a essa condição, sabe-se que a produção de fósforo livre pela atividade enzimática de fosfatase alcalina induz RNA osteopontina. A osteopontina é uma glicoproteína fosforilada secretada por osteoblastos para a mineralização da matriz extracelular. A relação existente entre os níveis de expressão de osteopontina e os níveis de fosfato, combinada com a habilidade de regulação de cálcio pela osteopontina, sugere que a função de transporte de cálcio atribuída a osteopontina acontece em condições de elevados níveis celulares de fosfato (BECK, ZERLER, AND MORAN, 2000). Esses achados corroboram com os resultados que evidenciam uma correlação entre o ensaio de alizarina (21 dias) e a concentração de cálcio e fósforo nos nódulos de mineralização, visualizados por EDS em 7 dias. Provavelmente, a produção precoce de fósforo nos grupos TEOS+KOH e BIOV se relaciona aos resultados mais expressivos para os ensaios de alizarina.

Tanto na avaliação morfológica de 14 dias quanto no ensaio de mineralização de 21 dias se observou claramente maior atividade celular para o grupo BIOV.

7 CONCLUSÃO

O protocolo físico e químico utilizado para criação de uma superfície rugosa de titânio produziu substratos com alto nível de padronização microestrutural, primordial para a adequada aplicação dos diferentes tipos de revestimentos, sem interferências significativas do substrato no resultado final. As etapas de síntese e aplicação dos vidros bioativos resultaram, dentro das limitações de um trabalho “*in vitro*”, em coberturas fisicamente estáveis, possibilitando boas respostas biológicas, apesar de apresentarem micro trincas em suas superfícies. Os revestimentos à base de vidro bioativo, independentemente da via de síntese, apresentaram resultados significativamente melhores do que as superfícies de titânio sem biovidro. O grupo BIOV apresentou os melhores resultados de atividade celular e mineralização ao longo dos 21 dias de avaliações. O vidro bioativo apresenta-se como uma opção para alavancar o processo de osseointegração, porém necessita de aprimoramentos na engenharia do material com relação a adesão ao titânio e solução para a formação de trincas. As superfícies testadas apresentaram-se viáveis e não citotóxicas para o crescimento de células osteoblásticas MC3T3. Os quatro grupos testados, T+KOH, TEOS, TEOS+KOH e BIOV apresentaram respostas biológicas positivas de mineralização, crescimento e multiplicação celular.

8 ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO SUBMETIDO AO “INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL & MAXILLOFACIAL IMPLANTS”

TITANIUM SURFACES MODIFIED BY BIOACTIVE GLASSES FOR INCREASING OSTEOGENIC ACTIVITY

Rodrigo Porto Guimarães ^{*a}, Rosana Zacarias Domingues ^b, Ludimila Gonçalves de Oliveira Xavier ^b, Kátia Lucy de Melo Maltos ^a, Ana Flôr Sá ^a, Vagner Eustáquio de Carvalho ^c, Daniel Cunha Elias ^c, José Augusto César Discacciati ^a, Allyson Nogueira Moreira ^a

^a Department of Restorative Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^b Department of Chemistry, Laboratory of Materials and Fuel Cells, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^c Department of physics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Corresponding author: Rodrigo Porto Guimarães, Av. Brasil 283, sala 1701, Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 30140-000 / Telephone: (+55)3132415547 / e-mail: rportog@gmail.com

Conflict-of-interest notification: *The authors declare no financial relationships and therefore no conflict of interest.*

Study supported by grants from Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG;APQ-01837-16).

TITANIUM SURFACES MODIFIED BY BIOACTIVE GLASSES FOR ENHANCED OSTEOGENIC ACTIVITY

Abstract

Objectives: Despite the consolidated success of dental implants under normal conditions, some biological challenges require a higher reactivity of the surface of implants. Seeking better performance in unfavorable metabolic situations or regions of poor bone quality, this in vitro experimental study aimed assess titanium surfaces covered with bioactive glasses synthesized by different routes: hydrolysis and condensation of chemical precursor alkoxy (TEOS), and colloidal suspension gelation (BIOV).

Material and Methods: The coating of the titanium substrate with bioactive glasses was characterized by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray excited photoelectron spectroscopy (XPS) and energy dispersive X-ray spectrometer (EDX). The morphology, adhesion, multiplication, mineralization and viability of cells on surfaces were investigated by in vitro assays.

Results: In the MTT assays in both trials (24hrs, 7days) was observed that the presence of the disks, by itself, created a less viable environment for the cells than the control medium without discs. By observing the trials separately, it is possible to report the absence of statistically significant differences between the groups tested ($p > 0.05$). In mineralization assays, the BIOV group presented, statistically, the highest concentration of mineralization nodules. The mineralization of the TEOS group did not differ significantly from the control group (T), despite showing a trend towards higher mineralization. After 7 days, analyzing the chemical composition by map and EDX images, we can see that the nodules formed in the T and TEOS groups are exclusively calcium, and the nodules formed in the BIOV group are composed of calcium and phosphorus. After 14 days, all the groups presented in the formation of their nodules the chemical elements calcium and phosphorus in great quantity, but again, a greater highlight is for the BIOV group, which presents in a more advanced process of mineralization, with a strong presence of calcium and phosphorus.

Conclusions: Bioactive glass coatings were able to stimulate osteoblastic activity to produce mineralization nodules, and regardless of the synthetic pathway, showed significantly better results than uncoated titanium surfaces.

Keywords: Surface modification; Osteoblasts; Bioactive glass; Cellular uptake

1. Introduction

Although the excellent level of success of titanium surfaces is sedimented in the literature, there are some biological challenges such as unfavorable metabolic conditions or regions of poor bone quality where greater bioactivity of the

surface is desired. In the search for innovations, the coating of surfaces with bioactive glass has had promising results, comparable to the coatings of hydroxyapatite (HA).¹

The ability of bioactive glass to stimulate bone regeneration at the cellular level is dependent on the levels of dissolution and formation of the hydroxyapatite layer, which can be controlled by the composition of the bioactive glass and by the sintering temperature.^{2,3}

The connectivity of the Si bonds is dictated by the composition and the synthesis method of the glasses. The silicate glasses are formed by joining several tetrahedral silicas connected by oxygen bridges. High silica content results in strongly connected bonds containing a large proportion of low dissolution oxygen bridges.^{4,5}

Glasses produced by the sol-gel method have a lower connectivity of bonds when compared to the glasses derived by the fusion method. This reduction in the network connectivity in combination with its inherent nanoporosity explains why glasses produced by the sol-gel method can be bioactive with up to 90 mol% of silica, while the glasses derived from the fusion are limited to 60 mol%.³

Seeking better clinical performance, we hypothesized that the coating of the titanium surface with bioactive glass would be able to accelerate cell attachment and differentiation, and consequent bone apposition. Thus, the present study produced, characterized and evaluated the biological response of two bioactive glass coatings synthesized at low temperatures by the sol-gel routes: hydrolysis and condensation of chemical precursor alkoxide (TEOS); and colloidal suspension gelation (BIOV).

2. Material and methods

2.1 Material

Pure titanium discs, grade 4, (4mm x 2mm) (PecLab, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), blasted with aluminum oxide and double acid attack (HNO₃/HF) were used as substrate for the bioactive glass coating.

2.2 Synthesis of the bioactive glass by the sol-gel route via hydrolysis and condensation of chemical precursor alkoxide (TEOS)

The system (SiO₂) was synthesized by the sol-gel route via hydrolysis of tetraethylorthosilicate (TEOS), catalyzed by acid, at a temperature between 24 and 26°C and with a relative humidity of less than 59%.^{6,7}

2.3 Synthesis of the bioactive glass by the sol-gel route via colloidal suspension gelation (BIOV)

Initially, 330 mL of 99% PA ethyl alcohol and 101 mL of distilled water were mixed in a 2L plastic beaker. Then, 21.2 g of silica (SiO₂) were added to the alcohol / water solution and stirred until complete homogenization. Sequentially, 31g of calcium chloride dihydrate PA (CaCl₂ .2H₂O) were added to the mixture and homogenized. Thereafter, 1.45mL of 85%

m/v phosphoric acid was incorporated into the mixture and also homogenized. The compound was stirred until viscous gel formation. The viscous gel was transferred to falcon tubes, which were left in the wet desiccator for 24 hours, and then placed in the oven at 60°C for 7 days until complete drying. The material was kept in an oven at 60°C until use. Initially, 3.0 g of bioactive glass were dispersed in a 20% ethanol / water solution using a tip ultrasound for five minutes. The titanium disks of the BIOV group were then washed with alkaline detergent and acetone to remove all residues. After cleaning, the discs were covered by the dispersion using the dip-coating method. After recoating, the pieces were left in the oven at 70°C for 24 hours to eliminate solvents.

2.4 Surface characterization

The scanning electron microscope (SEM) FEG-Quanta 3D FEG (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) equipped with focused ion beam (FIB), and energy dispersive X-ray detector (EDX; Bruker) was used for characterization surface microstructure, chemical analysis and osteoblastic cell morphology. The Tecnai G2-20 SuperTwin (FEI) -200 KV thermionic cannon (LaB₆) transmission electron microscope (TEM) equipped with EDX detector (EDAX) and Electron Energy Loss Detector (EEL; Gatan Image Filter) was used to measure the thickness of the bioactive glass layer applied to the titanium substrate through the cross sections of the lamellae produced by the FIB. The EDX and EEL detectors were also used for chemical composition analysis. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (Model PHI 5400, Perkin Elmer, USA) was used for the chemical characterization of the surface of different substrates.

2.5 *In vitro* assays

Immortalized pre-osteoblastic, calvarial cells from neonatal mice (MC3T3-E1, subclone14) were plated directly on the discs or control wells at 5×10^3 cells per well (10 μ L per well), having the volume of each one being completed to 100 μ L with osteogenic medium (American Type Culture Collection; Manassas, Virginia, USA). The osteogenic medium was changed every 2 days.

2.6 Cell viability assay - MTT

MTT tests were performed 24 hours and 7 days after cell culture. To this end, the culture medium present was aspirated into the wells of the microplate and 10 μ L of the MTT solution (5mg MTT / ml PBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) was added to each well. To the wells were added 90 μ L of culture medium without fetal bovine serum. The plate was incubated at 37 ° C for 3 hrs, protected from light. Next, the contents of the wells were aspirated and washed once with PBS solution. Subsequently, 50 μ L of DMSO (common) was added and allowed to act for 10 minutes at room temperature

for dissolution of the crystals. To read, 50 μ L of each well was transferred to a new culture plate and the optical density was measured by a spectrophotometer (Spectra Max 190, Molecular devices), at the wavelength of 540 nm.^{8,9}

2.7 Mineralization Testing

For the mineralization assays, the osteoblastic cells were cultured for 21 days. After this time, the wells were aspirated and washed thoroughly with PBS solution, pH 7.4, twice. The cells were then fixed with 60% isopropanol solution, diluted in distilled water, 200 μ L per well, for a period of 10 minutes in a 22°C environment. Isopropanol was then aspirated and the wells were washed with distilled water to rehydrate the cells. 200 μ l of alizarin red (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) at the 40 mM concentration at pH 4.2 were added to each well and allowed to act for 30 minutes under gentle shaking. Subsequently, the dye was aspirated and the wells were carefully washed with distilled water until the supernatant became clear. 200 μ L per well of 10% acetic acid solution in distilled water plus 4: 1 methanol (acetic acid: methanol) was added and left to stir for 30 minutes. After stirring, 200 μ L of each well was transferred to a new culture plate and the optical density was measured by a spectrophotometer (Spectra Max 190, Molecular Devices) at the 550 nm wavelength.¹⁰

2.8 Morphological evaluation of osteoblast

Osteoblastic cells were cultured for 7 and 14 days. After this time, the wells were aspirated and carefully washed twice with 150 μ l of 0.1 M phosphate buffer solution. The cells were then fixed with 150 μ l / well of 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1M phosphate buffer and left for 24 hours at 40°C. Next, the fixative solution was removed and 150 μ l of 0.1 M phosphate buffer added. The following stages of sample processing (secondary fixation with osmium tetroxide, dehydration, CO₂ critical point drying, metallization and stub assembly) were performed by the microscopy center of the Federal University of Minas Gerais.

3.0 Statistical analysis

Data were expressed as means and standard deviation. The ANOVA test followed by Tukey's post-hoc test was used for statistical analysis between groups. The confidence level was 95% and 99%.

4.0 Results

4.1 Microstructural characterization of surface topography

SEM images revealed specific characteristics in the surface topography of the different groups, as seen in the representative image of figure 1. The surface covered with bioactive glass (TEOS) (Fig.1A) presented a heterogeneously rough surface appearance, as it presented regions with high frequencies of peaks and valleys mixed with regions of flat, vitreous-like surfaces derived from cracking microplates. The surface covered with bioactive glass (BIOV) (Fig.1B) showed a rough, sandy appearance with large porosity, showing discontinuous micrometric cracks in characteristic areas of peaks.

4.2 Analysis of thickness and chemical composition of coating films

The TEM data show that the bioactive glasses of both groups are amorphous and exhibit thickness variations between the samples. The TEOS group had a mean thickness of 7.55nm (Fig. 2A) and the BIOV group, 1.02 μm (Fig 2B).

In a qualitative analysis by EELS, the Si and Ti contents were evaluated along an in-line profile, perpendicular to the orientation of the bioactive glass, the results are shown in Figures 2 A and B. The results show that the Si signal comes only from the region identified as bioactive glass in the TEM images. This is also shown by the EELS and EDX analyzes, comparing the X-ray spectra in the bioactive glass region and the titanium region.

The TEOS and BIOV groups showed strong Si peaks in exclusive regions of recoating, with absence of Ti. In the deep analysis, after the coating profile, Ti became the predominant element, with absence of Si. The presence of Si in coatings was expected to be the main chemical element that makes up the glass net. The BIOV group showed Ca, Cl and Si signals in the coating region and Ti in the substrate region. The P element present in the precursor chemical phosphoric acid (H_3PO_4) was not incorporated into the glass net. The Cl and Ca signals came from the chemical precursor CaCl_2 .

In the XPS analysis, the chemical composition of the samples can be observed in the complete low resolution spectrum (Fig. 3). Most of the carbon present on the surface of the TEOS sample represents contaminations due to exposure to the atmosphere. It is estimated that about 77% of the sample is composed of SiO_2 (or some SiO_x phase) and 12% by TiO_2 (together with the Ti_2O_3 phase). In the BIOV groups, the carbon signals also come from atmospheric contaminations, and it is estimated that about 53% of the sample is composed of SiO_2 (or some SiO_2 phase) and 22% by TiO_2 (together with the Ti_2O_3 phase). By the formation position of the peaks, it is possible to confirm the presence of CaCl_2 and Ca-Cl binding.

4.5 Cell viability assay (MTT)

The viability of the osteoblastic cells was evaluated by the MTT assay in two distinct periods: 24 hours and 7 days (Fig. 4). In both trials, it was observed that the presence of the disks, by itself, created a less viable environment for the cells than the control medium without discs. By observing the trials separately, it is possible to report the absence of statistically significant differences between the groups tested ($p > 0.05$). When comparing the level of absorbance between trials, 24 hrs and 7 days, a significant increase in cell viability was observed in all groups.

4.6 Mineralization Test (Alizarin)

The production of mineralization nodules in the bone matrix was evaluated by the red alizarin assay after 21 days of culture. Mineralization results are given by the dye concentration in μM (Fig. 5). The BIOV group presented, statistically, the highest concentration of mineralization nodules. The mineralization of the TEOS group did not differ significantly from the control group (T), despite showing a trend towards higher mineralization.

4.7 Images of cellular morphology and calcification nodules with respective chemical analysis by EDX.

Images of the morphology of osteoblastic cells and calcification nodules were performed by SEM after 7 and 14 days of cell culture, besides the chemical analysis of the nodules, by EDX.

The images performed after 7 days of culture (Fig. 6A) showed similarity between groups in relation to cell concentration, intercellular spacing and polygonal morphology. At the 5000X increase, the formation of some small mineralization nodules was observed in all groups, confirmed by the presence of calcium peak in the EDX mapping (Fig.6B). The BIOV group calls attention for the formation of larger mineralization plaques formed under the cells. Analyzing the chemical composition by map (Fig.6B) and EDX images (Fig. 6A), we can see that the nodules formed in the T and TEOS groups are exclusively calcium, and the nodules formed in the BIOV group are composed of calcium and phosphorus.

After 14 days of culture (Fig. 7A), in all groups, no intercellular spacing is observed. A compact cell mass permeated by many nodules of calcification interlaced by cytoplasmic extensions forms the extracellular bone matrix. In the SEM images, the BIOV group is distinguished by the advanced process of forming a compact and homogeneous matrix, where cells can not be discerned from the mineralized matrix. In the EDX images, all the groups present in the formation of their nodules the chemical elements calcium and phosphorus in great quantity, but again, a greater highlight is for the BIOV group, which presents in a more advanced process of mineralization, with a strong presence of calcium and phosphorus. In the analysis of the EDX map (Fig. 7B), in all the groups, an accentuation of the calcium peak and the distinction of the peak of phosphorus with respect to the osmium, element present in the fixative solution, is observed.

5.0 Discussion

In this study, bioactive glass coatings were processed by the sol-gel route, by two different pathways, hydrolysis and condensation of chemical alkoxy precursor (TEOS), and colloidal suspension gelation. Both resulted in bioactive glass coverings with presence of cracks caused by different reasons. In the traditional blending route of bioactive glass at high temperatures on the titanium surface, the coefficient of thermal expansion of the glass must coincide with that of the metal to prevent the coating from cracking and peeling off the surface during processing. Some studies, such as Jones (2015), sought to adjust the coefficient of thermal expansion by changing the chemical composition of the glass net.² The substitution of Na_2O

by K₂O and CaO by MgO was the key to adjust the expansion. However, this composition is a fine line between bioactivity and bio-inertia.

Although, in this study, the synthesis of the bioactive glasses does not go through the sintering process, there are other causes in the formation of the crack by the solgel process, other than the high temperatures.

The bioactive glass synthesized via chemical precursor TEOS passes through the formation of a wet gel due to the excess water of the reagents and to the alcohol and water resulting from the hydrolysis and condensation reaction process. As water and alcohol evaporate during drying, they leave a network of pores susceptible to cracking caused by the contraction.

The bioactive glass synthesized via colloidal suspension gelation (BIOV) does not present in its synthesis evaporation of by-products of condensation and hydrolysis reactions, however, it presented cracks probably caused by the great thickness of the coating, which was 100 times larger than the TEOS. These results corroborate with the study by Valliant (2012), which reports that colloidal system results in structures of sub micrometric scales, whereas the alkoxide system exhibits structures in nanometric scales.¹¹

In the TEOS groups, we observed at the initial moment, before the contact with the osteogenic solution of cell culture, the formation of crack in the format of microplates that appeared to depart from the titanium substrate. The appearance of the cracks remained unchanged after a 7-day cell culture evaluation, which suggests that the aqueous attack on the Si-O network did not contribute to the increase in cracking.

In the BIOV group, the cracks evaluated before the aqueous contact were discontinuous without plaque formation. However, after 7 days of contact with osteogenic medium solution, the cracks increased and merged in block format (Fig. 6 A). But because the coating was thicker, it did not appear to detach to the titanium substrate. The results corroborate with the study by Boyer *et al.* (2007), which reports that the aqueous attack to the Si-O network of the glass seems to be the dominant mechanism in the crack growth in these bioactive glasses. The increase in cracks was controlled by chemical reactivity, where the results suggest that the increase of bioactivity in the regions of cracks, generated the growth of these cracks.¹²

The studies of Xynos *et al.* (2001), Carvalho *et al.* (2009), Hench (2006), when evidencing the association between ionic dissolution of bioactive glasses and cellular activity, corroborate with the results of this research. Despite the appearance of cracks in bioactive glazing coverings, the cell growth was not disturbed after 7 or 14 days of cellular morphology evaluation, and was even higher in relation to the surface that did not receive bioactive glass coverage (T), probably because the cracks and their increase is related to the ionic dissolution of bioactive glasses and the direct effect on the gene expression of osteoblasts.^{13,14,15}

Research by Wilson *et al.* (1981) and Foppiano *et al.* (2004) evaluated the toxicity and biocompatibility of bioactive glasses and concluded that these can be considered cytocompatible because they do not have significantly negative effects, leachable substances that produce inflammatory process and do not impede growth and divisions in cell culture.^{16,17} Corroborating with the studies of Wilson *et al.* (1981) and Foppiano *et al.* (2004), the results of Carvalho *et al.* (2009) in MTT analysis for 72 hours showed increased cell viability for cementoblasts, osteoblasts and fibroblasts in contact with ionic dissolution products of bioactive glass with 60% silica (BG60S).^{14,16,17} Our study presents results compatible with the research

of Wilson et al. (1981) and Foppiano et al. (2004) because they did not present cytotoxicity in the ionic products of the bioactive glasses when in contact with the cells, but did not corroborate with the results of Carvalho et al. (2009), because it did not present significantly greater cell viability for bioactive glass coatings when compared to the control group (T), without coverage. In addition, all groups had statistically lower cell viability than the control group (without discs), results that corroborate with the studies of Lavos-Valereto (2002) and indicate a lower viability simply by the presence of discs.¹⁸

The control of the ionic dissolution dosages is important because the excess of ions can be toxic to the cells. The expression of the genes is dose-dependent, with the highest gene expression observed at the concentration of 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of soluble silica and 60-90 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of calcium ions.¹⁹ According to the studies of Maeno et al. (2005), the concentration of Ca^{+2} ions in contact with osteoblasts presents a range of values related to the survival, differentiation or apoptosis of osteoblastic cells.²⁰ Hench (2009) reports that the rate of dissolution and ionic release can be neither so high as to be ineffective, nor so low as not to stimulate cell differentiation and proliferation. In this study, the absence of statistical difference between the groups during the 7 and 14 day MTT assays suggests that there is no negative effect of the bioactive glass solubilization rate of the TEOS and BIOV groups for cell viability.¹⁹

Positive results regarding the mineralization assay suggest a favorable ionic dissolution to cellular genetic stimuli for bone matrix mineralization by osteoblasts. The best results for the BIOV group corroborate with the studies of Anitua et al. (2015) that attributes the improvement of the mineralization parameters to the presence of calcium ions.²¹

The 7-day cell morphology analyzes performed by SEM images show compatible aspects to the results of MTT assays (7 days). From the images, no difference was observed in the groups regarding cell population, distance between cells, morphology and adherence, which leads us to the results of statistical indifference for cell viability.

The presence of calcium and phosphorus in the composition of the nodules formed on the surface of the BIOV group in the 7 day analysis may be related to the early production of free phosphorus by the enzymatic activity of alkaline phosphatase.

Associated with this condition, it is known that the production of free phosphorus by the enzymatic activity of alkaline phosphatase induces RNA osteopontin. Osteopontin is a phosphorylated glycoprotein secreted by osteoblasts for extracellular matrix mineralization. The relationship between osteopontin expression levels and phosphate levels, combined with osteopontin's ability to regulate calcium, suggests that the calcium transport function attributed to osteopontin occurs under high phosphate cell levels.²² This study corroborates the results evidencing the concentration of calcium and phosphorus in the mineralization nodules, visualized by EDX (7 days), where probably the early production of phosphorus in the BIOV group is related to the most expressive results for alizarin assays.

5.0 Conclusion

The surfaces tested were viable and non-cytotoxic for growth of MC3T3 osteoblastic cells. The two TEOS and BIOV tested groups presented positive biological responses of mineralization, growth and cell multiplication. Bioactive glass coatings, regardless of the synthetic route, showed significantly better results than titanium surfaces without coating. The BIOV group presented the best result for the mineralization. Bioactive glass presents itself as an option to leverage the osseointegration process, but it needs improvements in material engineering.

Acknowledgements

I would like to thank student Clóvis Guerim Vieira for his help.

Conflict-of-interest notification: The authors declare no financial relationships and therefore no conflict of interest.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG;APQ-01837-16).

References

1. Xuereb M, Camilleri J, Attard N. Systematic Review of Current Dental Implant Coating Materials and Novel Coating Techniques. *Int J Prosthodont* 2015; 28: 51–59.
2. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hensch to hybrids. *Acta Biomater* 2015; 23: 53–82.
3. Pereira MM, Clark AE, Hensch LL. Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface. *J Am Ceram Soc* 1995; 78: 2463–2468.
4. Mercier C, Follet-Houttemane C, Pardini A, Revel B. Influence of P₂O₅ content on the structure of SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅ bioglasses by ²⁹Si and ³¹P MAS-NMR. *J Non Cryst Solids* 2011; 357: 3901–3909.
5. Martin RA, Yue S, Hanna JV, Lee PD, Newport RJ, Smith ME, et al. Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* 2012; 370: 1422–1443.
6. Domingues RZ, Clark AE, Brennan AB. A sol-gel derived bioactive fibrous mesh. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 468-474.
7. Federativa B, Brasil DO. Carta patente nº pi 0200698-7. 2018; 901(72).
8. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; 94: 57–63.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods* 1983; 65: 55-63.

10. Lin TH, Yang RS, Tang CH, Wu MY, Fu WM. Regulation of the maturation of osteoblasts and osteoclastogenesis by glutamate. *Eur J Pharmacol* 2008; 589: 37-44.
11. Valliant EM, Turdean-Ionescu CA, Hanna JV, Smith ME, Jones JR. Role of pH and temperature on silica network formation and calcium incorporation into sol-gel derived bioactive glasses. *J Mater Chem* 2012; 22: 1613–1619.
12. Bloyer DR, McNaney JM, Cannon RM, Saiz E, Tomsia AP, Ritchie RO. Stress-corrosion crack growth of Si-Na-K-Mg-Ca-P-O bioactive glasses in simulated human physiological environment. *Biomaterials* 2007; 28: 4901–4911.
13. Xynos D, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 151–157.
14. Carvalho S, Oliveira A, Andrade V, de Fatima Leite M, Goes A, Pereira M. Comparative Effect of the Ionic Products from Bioactive Glass Dissolution on the Behavior of Cementoblasts, Osteoblasts, and Fibroblasts. *Key Eng Mater* 2008; 396-398: 55–59.
15. Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med* 2006; 17: 967–978.
16. Wilson J, Pigott GH, Schoen FJ, Hench LL. Toxicology and biocompatibility of bioglasses. *J Biomed Mater Res* 1981; 15: 805–817.
17. Foppiano S, Marshall SJ, Marshall GW, Saiz E, Tomsia AP. The influence of novel bioactive glasses on in vitro osteoblast behavior. *J Biomed Mater Res* 2004; 71: 242–249.
18. Lavos-valereto IC, Deboni MC, Azambuja NJ, Marques MM. Evaluation of the Titanium Ti-6Al-7Nb Alloy With and Without Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coating on Growth and Viability of Cultured Osteoblast-Like Cells. *J Periodontol* 2000; 73: 900-905.
19. Hench LL. Genetic design of bioactive glass. *J Eur Ceram Soc* 2009; 29: 1257–1265.
20. Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 2005; 26: 4847–4855.
21. Anitua E, Piñas L, Murias A, Prado R, Tejero R. Effects of calcium ions on titanium surfaces for bone regeneration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015; 130: 173–181.
22. Beck GB, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 8352–8357.

LEGENDS

Fig. 1. Surface topography images performed by SEM in the groups (A) TEOS and (B) BIOV.

Fig. 2. (A) TEM image of TEOS group; EEL spectrum of the bioactive glass made at point 1 indicated in the left image; signal counting profile of Si and Ti by EELS along the line perpendicular to the bioactive glass shown in the left image. (B) TEM image of BIOV group; signal counting profile of Si and Ti by EELS along the line perpendicular to the bioactive glass; EDX spectra of points 1 and 2 shown in the left image.

Fig. 3. Low resolution XPS spectrum of the TEOS (A) and BIOV (B) group.

Fig. 4. Cell viability of osteoblasts cultured in 24 hours (A) and 7 days (B) in the control, T, TEOS and BIOV groups, measured in absorbance. ANOVA - Tukey's multiple comparison test: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Fig. 5. Mineralization of the matrix, stained with alizarin red (dye concentration in μM) after 21 days of osteoblast culture in the T, TEOS and BIOV groups. ANOVA - Tukey's multiple comparison test: ** $p < 0.01$

Fig. 6. 7 days of cell culture. (A) Cell morphology images (1200x and 5000x), EDX images (calcium and phosphor) and (B) chemical map (EDX). Groups T, TEOS and BIOV.

Fig. 7. 14 days of cell culture. (A) Cell morphology images (1200x and 5000x), EDX images (calcium and phosphor) and (B) chemical map (EDX). Groups T, TEOS and BIOV.

FIGURES

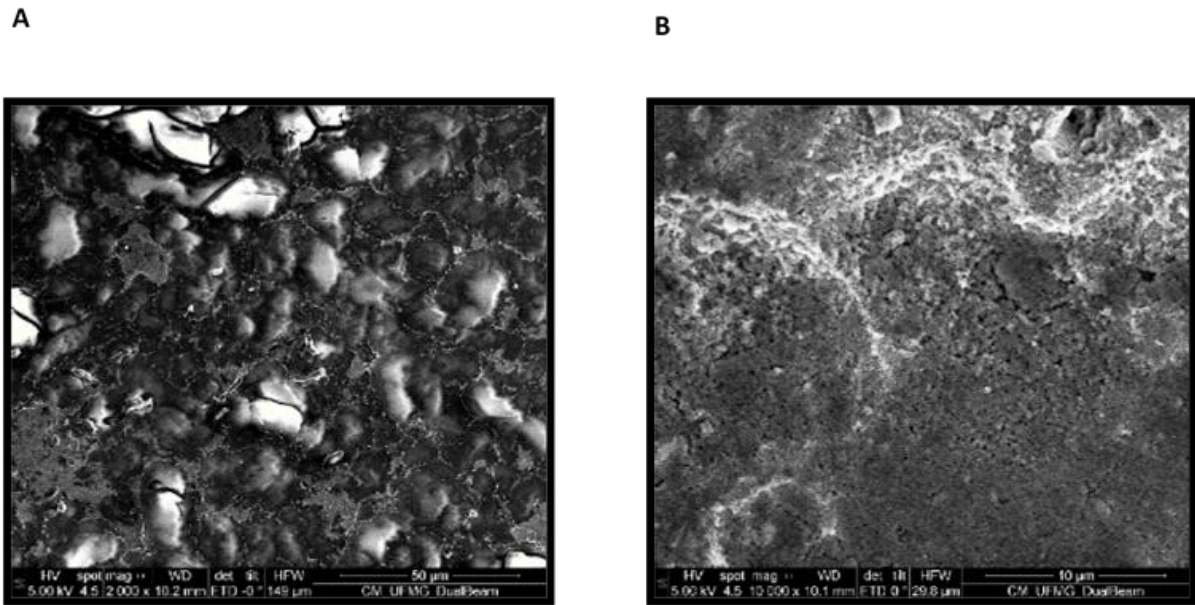


Fig. 1 A and B

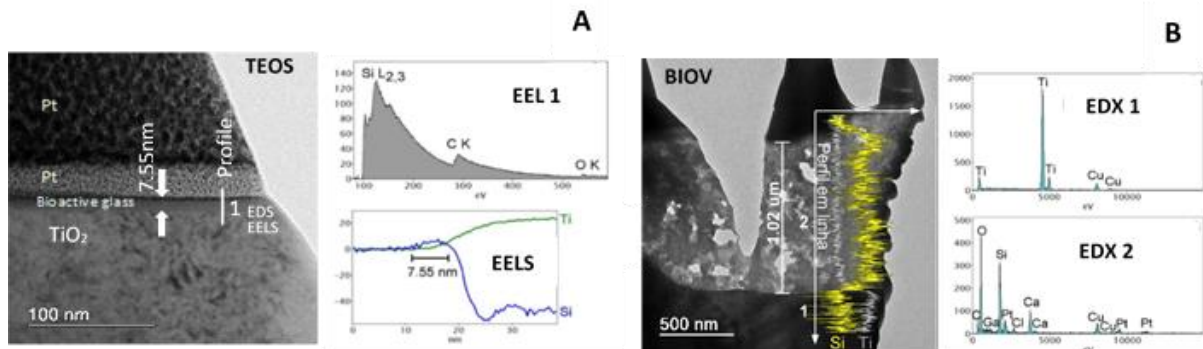


Fig. 2 A and B

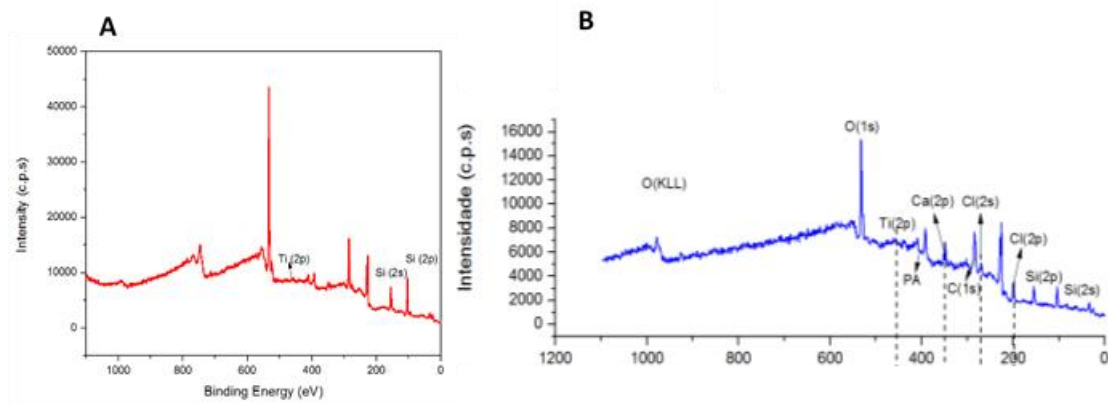


Fig. 3 A and B

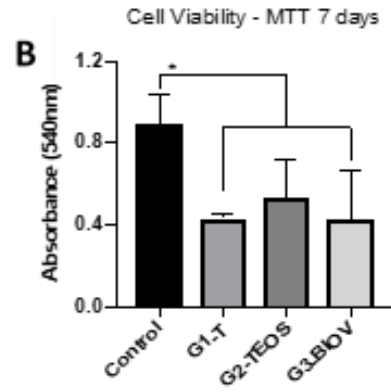
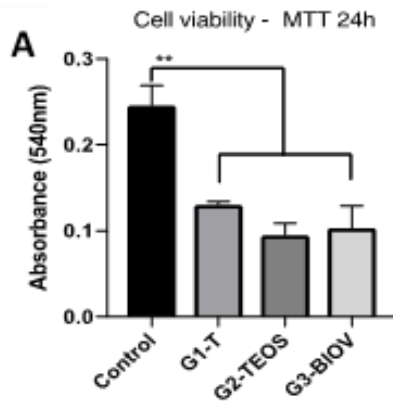


Fig. 4 A and B

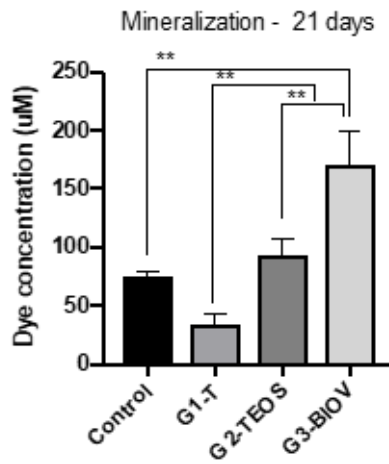


Fig. 5

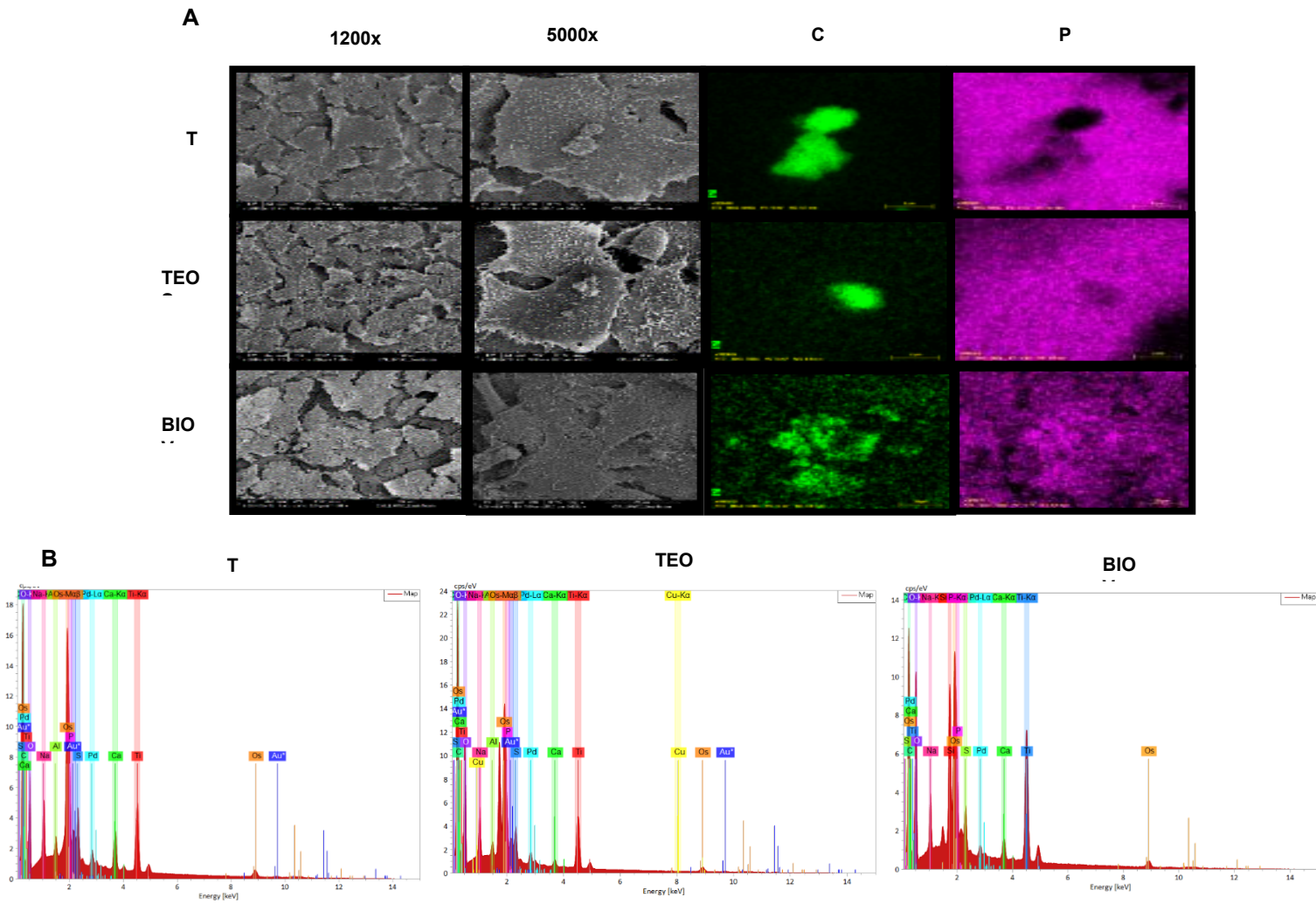


Fig. 6 A and B

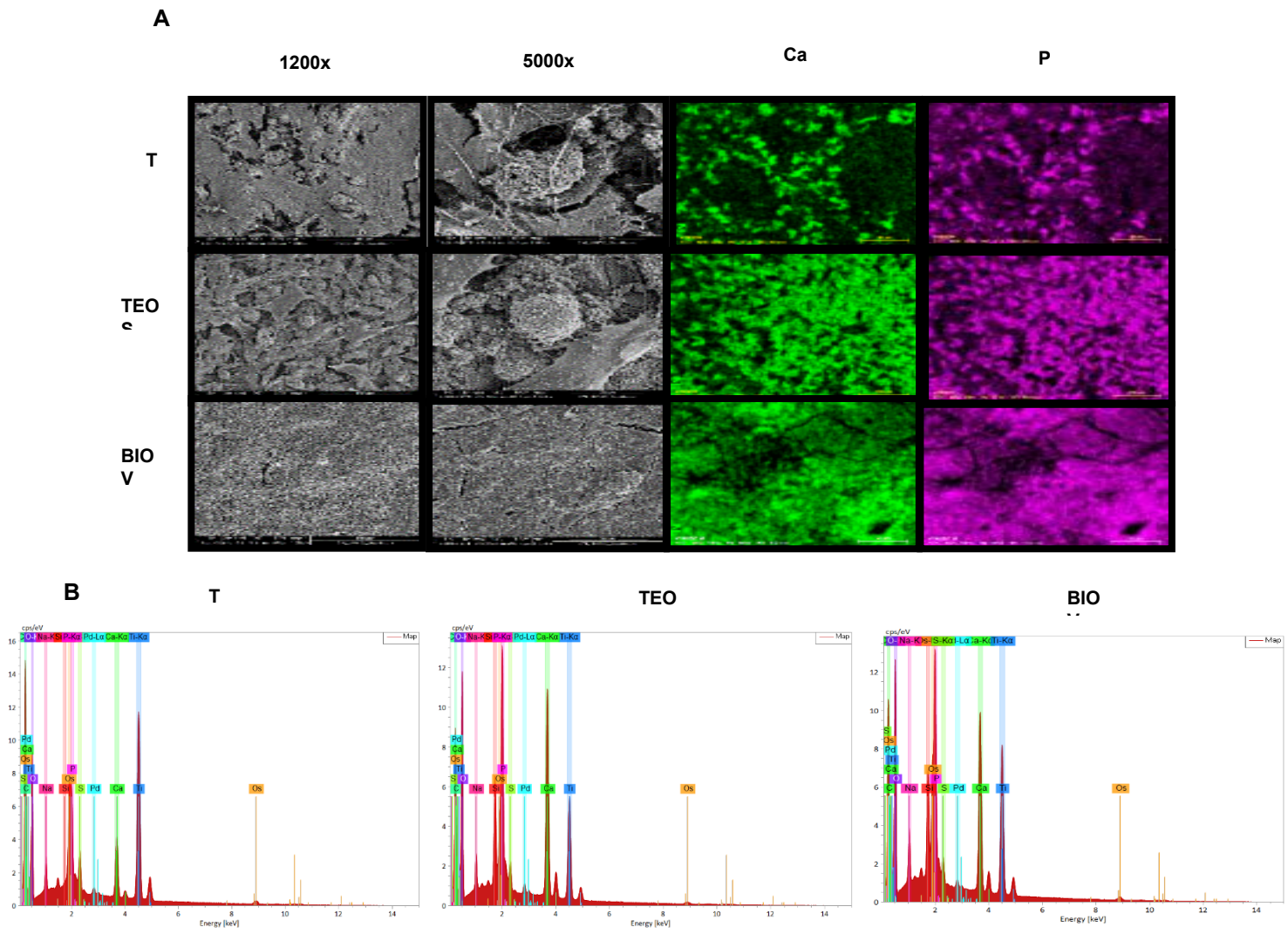


Fig. 7 A and B

Referências

- [1] E. Anitua, L. Piñas, A. Murias, R. Prado, R. Tejero, Effects of calcium ions on titanium surfaces for bone regeneration, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 130 (2015) 173–181.
- [2] M. Xuereb, J. Camilleri, N. Attard, Systematic Review of Current Dental Implant Coating Materials and Novel Coating Techniques, *Int. J. Prosthodont.* 28 (2015) 51–59.
- [3] J.R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 23 (2015) 53–82.
- [4] I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 151–157.
- [5] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface, *J. Am. Ceram. Soc.* 78 (1995) 2463–2468.
- [6] L.L. Hench, Genetic design of bioactive glass, *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 1257–1265.
- [7] S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto, H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, et al., The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture, *Biomaterials* 26 (2005) 4847–4855.
- [8] P. Valerio, M.M. Pereira, A.M. Goes, M.F. Leite, Effects of extracellular calcium concentration on the glutamate release by bioactive glass (BG60S) preincubated osteoblasts, *Biomed. Mater.* 4 (2009) 1-7.
- [9] D.M. Reffitt, N. Ogston, R. Jugdaohsingh, H.F.J. Cheung, B.A.J. Evans, R.P.H. Thompson, et al., Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro, *Bone* 32 (2003) 127–135.
- [10] R.A. Martin, S. Yue, J. V. Hanna, P.D. Lee, R.J. Newport, M.E. Smith, et al., Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration, *Philos. Trans. R. Soc. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (2012) 1422–1443.
- [11] C. Mercier, C. Follet-Houttemane, A. Pardini, B. Revel, Influence of P2O5 content on the structure of SiO2-Na2O-CaO-P2O5 bioglasses by 29Si and 31P MAS-NMR, *J. Non. Cryst. Solids* 357 (2011) 3901–3909.
- [12] S. Lin, C. Ionescu, K.J. Pike, M.E. Smith, J.R. Jones, Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 1276-1282.
- [13] R.Z. Domingues, A.E. Clark, A.B. Brennan, A sol-gel derived bioactive fibrous mesh, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 468-474.
- [14] Federativa B, Brasil DO. Carta patente nº pi 0200698-7. 2018;901(72).
- [15] D. Gerlier, N. Thomasset, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J.*

Immunol. Methods 94 (1986) 57–63

- [16] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55-63.
- [17] T.H. Lin, R.S. Yang, C.H. Tang, M.Y. Wu, W.M. Fu. Regulation of the maturation of osteoblasts and osteoclastogenesis by glutamate. *Eur. J. Pharmacol.* 589 (2008) 37-44.
- [18] M.A. Alfarsi, S.M. Hamlet, S. Ivanovski, Titanium surface hydrophilicity modulates the human macrophage inflammatory cytokine response, *J. Biomed. Mater. Res.* 102 (2014) 60–67.
- [19] B.S. Kopf, S. Ruch, S. Berner, N.D. Spencer, K. Maniura-Weber, The role of nanostructures and hydrophilicity in osseointegration: In-vitro protein-adsorption and blood-interaction studies, *J. Biomed. Mater. Res.* 103 (2015) 2661–2672.
- [20] A.E. Clark, L.L. Hench, M. Science, The Influence of Surface Chemistry on Implant Interface. *Histology : A Theoretical Basis for Implant Materials Selection* (1976) 161–74.
- [21] A. B. Novaes Jr, S. L. S. de Souza, R. R. M. de Barros, K. K. Y. Pereira, G. Iezzi, A. Piattelli, Influence of implant surfaces on osseointegration, *Braz. Dent. J.* 21 (2010) 471–81.
- [22] N. Drnovšek, S. Novak, U. Dragin, M. Čeh, M. Gorenšek, M. Gradišar, Bioactive glass enhances bone ingrowth into the porous titanium coating on orthopaedic implants, *Int. Orthop.* 36 (2012) 1739–1745.
- [23] A. Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review, *Clin. Oral. Implants Res.* 20 (2009) 172–184.
- [24] E.M. Valliant, C.A. Turdean-Ionescu, J. V. Hanna, M.E. Smith, J.R. Jones, Role of pH and temperature on silica network formation and calcium incorporation into sol-gel derived bioactive glasses, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 1613–1619.
- [25] D. R. Bloyer, J. M. McNaney, R. M. Cannon, E. Saiz, A. P. Tomsia, R.O Ritchie, Stress-corrosion crack growth of Si-Na-K-Mg-Ca-P-O bioactive glasses in simulated human physiological environment, *Biomaterials* 28 (2007) 4901–4911.
- [26] S. Carvalho, A. Oliveira, V. Andrade, M. de Fatima Leite, A. Goes, M. Pereira, Comparative Effect of the Ionic Products from Bioactive Glass Dissolution on the Behavior of Cementoblasts, Osteoblasts, and Fibroblasts, *Key Eng. Mater.* 396-398 (2009) 55–59.
- [27] L.L. Hench, The story of Bioglass®. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 967–978.
- [28] J. Wilson, G.H. Pigott, F.J. Schoen, L.L. Hench, Toxicology and biocompatibility of bioglasses, *J. Biomed. Mater. Res.* 15 (1981) 805–817.
- [29] S. Foppiano, S.J. Marshall, G.W. Marshall, E. Saiz, A.P. Tomsia, The influence of novel bioactive glasses on in vitro osteoblast behavior, *J. Biomed. Mater. Res.* 71 (2004) 242–249.
- [30] I.C. Lavos-valereto, M.C. Deboni, N.J. Azambuja, M.M. Marques, Evaluation of the Titanium Ti-6Al-7Nb Alloy With and Without Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coating on Growth and Viability of

Cultured Osteoblast-Like Cells, *J. Periodontol.* 73 (2000) 900-905.

[31] G.R. Beck, B. Zerler, E. Moran, Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 8352–8357.

ARTIGO ACEITO PELA REVISTA “JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS”

**KOH GROUP INFLUENCE ON TITANIUM SURFACES AND PURE SOL-GEL SILICA FOR
ENHANCED OSTEOGENIC ACTIVITY**

Rodrigo Porto Guimarães ^{*a}, Rosana Zacarias Domingues ^b, Ludimila Gonçalves de Oliveira Xavier ^b,
Kátia Lucy de Melo Maltos ^a, Cinthia Mara da Fonseca Pacheco ^a, Ana Flôr Sá ^a, Vagner Eustáquio de
Carvalho ^c, Daniel Cunha Elias ^c, José Augusto César Discacciati ^a, Allyson Nogueira Moreira ^a

^aDepartment of Restorative Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^bDepartment of Chemistry, Laboratory of Materials and Fuel Cells, Federal University of Minas Gerais,
Belo Horizonte, Brazil.

^cDepartment of physics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Corresponding author: Rodrigo Porto Guimarães, Av. Brasil 283, sala 1701, Santa Efigênia, Belo
Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 30140-000 / Telephone: (+55)3132415547 / e-mail:
rportog@gmail.com

Conflict-of-interest notification: *The authors declare no financial relationships and therefore no conflict
of interest.*

Study supported by grants from Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG;APQ-
00542-14).

KOH GROUP INFLUENCE ON TITANIUM SURFACES AND PURE SOL-GEL SILICA FOR ENHANCED OSTEOGENIC ACTIVITY

ABSTRACT

Although, the excellent level of success of titanium surfaces is based on the literature, there are some biological challenges such as unfavorable metabolic conditions or regions of poor bone quality where greater surface bioactivity is desired. Seeking better performance, we hypothesized that silica-based coating via sol-gel route with immersion in potassium hydroxide basic solution induces acceleration of bone mineralization. This in vitro experimental study coated titanium surfaces with bioactive glass synthesized by route sol-gel via hydrolysis and condensation of chemical alkoxide precursor, tetraethylorthosilicate (TEOS) and / or deposition of chemical compound potassium hydroxide (KOH) to accelerate bone apposition. The generated surfaces titanium(T), titanium with potassium hydroxide deposition (T + KOH), titanium with bioactive glass deposition synthesized by sol-gel route via tetraethylorthosilicate hydrolysis (TEOS), titanium with bioactive glass deposition synthesized by sol-gel route via tetraethylorthosilicate hydrolysis with potassium hydroxide deposition (TEOS + KOH) were characterized by 3D optical profilometry, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), contact angle by the sessile drop method, x-ray excited photoelectron spectroscopy (XPS) and energy dispersive x-ray spectrometer (EDX). The addition of the KOH group on the pure titanium (T) or bioactive glass (TEOS) surfaces generated a tendency for better results for mineralization. Groups covered with bioactive glass (TEOS, TEOS + KOH) tended to outperform even groups with titanium substrate (T, T + KOH). The addition of both, bioactive glass and KOH, in a single pure titanium substrate yielded the best results for the mineralization process.

Keywords: dental implants, surface modification; osteoblasts; bioactive glass; cellular uptake

INTRODUCTION

A bioactive material is capable of eliciting specific biological responses, which result in the formation of an interfacial bond between adjacent tissue and the material. This bonding occurs through the chemical and structural equivalence of the hydroxycarbonated apatite (HCA) phase, which forms on the implant surface and is present in the bone mineral structure.¹

There are two mechanisms by which bioactive glass stimulates osteogenesis and binds to bone. The dissolution of the glass layer products genetically stimulates the process of mitosis, differentiation and bone matrix production by progenitor bone cells. In addition, the formation of the HCA layer is responsible for binding to bone through collagen fibrils and fixation of progenitor bone cells.²

The HCA layer forms by dissolving the glass through a mechanism similar to the corrosion process. As the glass surface solubilizes, the dissolution products alter the chemical composition and pH of the medium, providing favorable surface locations and pH for HCA nucleation. The sequence of HCA formation occurs initially by the ionic exchange of Si, Na, Ca and P of the glass with the H⁺ of the solution, creating silanol (Si-OH) bonds on the glass surface. The increase in local pH leads to the attack of the glass silica bonds by the OH⁻ group, breaking the Si-O-Si bond. Soluble silica is lost as Si(OH)₄ to the solution, leaving more silanol (SiOH) at the glass-solution interface. Then, condensation of the silanol groups occurs near the glass surface and repolymerization of the silica rich layer. Groups migrate from the solution to the surface, forming an amorphous CaO-P₂O₅ rich film. Finally, incorporation of carbonate and hydroxyl groups from the solution and crystallization of the CaO-P₂O₅ film to HCA.^{1,2}

The ability of bioactive glass to stimulate bone regeneration at the cellular level is dependent on the levels of dissolution and formation of the hydroxyapatite layer, which can be controlled by bioactive glass composition and sintering temperature.^{2,3}

Properties of bioactive glass, such as dissolution rate and rate of formation of hydroxycarbonate apatite (HCA) are the result of atomic structure.⁴ The connectivity of Si bonds is dictated by the composition and method of glass synthesis. Silicate glasses are formed by joining various tetrahedral silicas connected by oxygen bridges. Silicon is therefore the bonding atom of glass. High silica content results in tightly connected bonds containing a large proportion of low dissolving oxygen bridges.⁵

However, glasses produced by the sol-gel method have lower bond connectivity when compared to glasses derived by the fusion method. This reduction in network connectivity in combination with its inherent nanoporosity

explains why glasses produced by the sol-gel method can be bioactive with up to 90 mol% silica, while fusion-derived glasses are limited to 60 mol%.³ In sol-gel glass, hydrogen acts by breaking the silica network, generating a high concentration of Si-OH group, increasing the dissolution rate and providing apatite nucleation sites.⁶ The OH content of sol-gel glass depends on the conditions used in synthesis, such as final stabilization or sintering temperature.⁷ We aim to integrate desired properties of silica and the hydroxyl group into the titanium surface coating, in order to increase the ability of bone regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Grade 4, pure titanium (T) discs (PecLab, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) (4mm x 2mm), blasted with aluminum oxide, 250 mesh, and double acid etching, nitric acid solution 70% (HNO₃) (Merck, Germany) / hydrofluoric acid solution 32% (HF) (Merck, Germany), (10% vol. HNO₃ / 1%vol. HF), served as substrate for bioactive glass coating and deposition of potassium hydroxide 85% (KOH) (Química Moderna, Brazil). Initially, sandblasting with 250 mesh aluminum oxide was processed in a 6 kg / cm₂ pressure chamber at a distance of 7 cm for a period of 30 sec. Then, the discs went through a cleaning and decontamination process to remove residues deposited by the machining and blasting process, following the standards of ASTM B600. Cleaning was performed by immersing discs in a nitric acid solution (70%) (Merck, Germany) 10 to 30% vol. (150 to 450 g / L) and hydrofluoric acid (60%) (Merck, Germany) 1 to 3% vol. (12 to 36 g / L) at 49°C (120°F), maintained at a ratio of 10 parts nitric acid (Merck, Germany) to 1 part hydrofluoric acid. After this process, the pieces were washed ten times with distilled water and acetone to remove residues.

Synthesis of bioactive glass by sol-gel route via hydrolysis and condensation of chemical alkoxide precursor (TEOS)

The system (SiO₂) was synthesized by the sol-gel route via tetraethylorthosilicate hydrolysis (98%), 30ml (TEOS) (Sigma,EUA) , catalyzed by acid at a temperature between 24 and 26 °C and a relative humidity of less than 59%. To form the bioactive glass, TEOS was added to an alcoholic solution, at pH 1.5, under constant stirring. The molar ratio of the solution was 1: 4: 1.5-2 (TEOS:ethanol, 99,8%, 30ml (Sigma, EUA): hydrochloric acid solution 4.90ml, 3.16x10²molL⁻¹ (HCl Solution) (Sigma, EUA)).⁸ The solution was stirred for 30 minutes until the immersion process. Group III (TEOS) and IV (TEOS + KOH) titanium discs were then washed with alkaline

detergent and acetone to remove - residues. After cleaning, the discs were covered by sol-gel using the dip-coating method. After coating, the pieces were left in the vacuum oven at 37 °C for 15 days for complete formation of the bioactive glass mesh.⁹

Technique of coating the titanium surface with bioactive glasses

The disks of the groups (TEOS) and (TEOS + KOH) received bioactive glass coating by immersion controlled by the dip-coating technique. For immersion control, equipment developed by the materials and construction engineering department (DEMC) of the UFMG engineering school was used under the guidance of prof. Dr. Manuel Houmard. In order to obtain a homogeneous film thickness of the sample, the angle between the piece and the sol (90°) was kept constant, in addition to a programmed immersion inlet and outlet speed at 1.05 (\pm 0.02) cm .min⁻¹. After the immersion process, the pieces were exposed to the air for about 30 minutes, at room temperature. The thickness of the glass film formed on the substrate is directly related to the immersion speed. The slower the substrate is removed from the solution, the thinner the glass film formed and the greater the probability of maintaining the original substrate morphology.

Deposition of the chemical compound potassium hydroxide (KOH)

The deposition of the chemical potassium hydroxide on the surface of the samples of groups II (T + KOH) and IV (TEOS + KOH) was made by immersing the discs in 0.1 mol / L potassium hydroxide solution under constant agitation. The samples were immersed using the dip-coating technique, with a programmed immersion inlet and outlet velocity of 1.05 (\pm 0.02) cm.min⁻¹. After the immersion process, the pieces were exposed to air for about 30 minutes at room temperature.

Table 1. Description of sample groups

T	T+KOH	TEOS	TEOS+KOH
Grade 4, pure titanium discs, blasted with aluminum Oxide, 250 mesh, and double acid etching.	Titanium substrate with potassium hydroxide deposition.	SiO ₂ synthesized by the sol-gel route via tetraethylorthosilicate hydrolysis.	SiO ₂ synthesized by the sol-gel route via tetraethylorthosilicate hydrolysis with potassium hydroxide deposition.

Surface characterization

Scanning electron microscopy (SEM)

This study used the scanning electron microscopy (SEM) technique, with an acceleration voltage equal to 5KV for the microstructural characterization of the surface and the morphology of osteoblastic cells. For SEM analysis, the samples were placed in aluminum stubs, fixed with double-sided carbon tape. Secondary electron imaging and EDX analysis were performed. The samples were analyzed in triplicate using the scanning electron microscope (SEM) FEG - Quanta 3D FEG (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) equipped with focused ion beam (FIB), and with X-ray detector by energy dispersion (EDX; Bruker), available by the UFMG microscopy center.

3D optical profilometer

The 3D optical profilometer (Zygo New View 7300, Harpenden, UK) with a resolution of 100 nm (in Z) over an area of 2 mm was used to measure the average surface roughness.

Transmission electron microscope (TEM)

The Tecnai G2-20 SuperTwin (FEI) -200 KV thermionic cannon (LaB₆) transmission electron microscope (TEM), with primary beam accelerated to 200 kV, equipped with (Si)Li EDX detector with 30 mm² window (EDAX) and Electron Energy Loss Detector (EEL; Gatan Image Filter) was used to measure the thickness of the bioactive glass layer applied to the titanium substrate through the cross sections of the lamellae produced by the FIB. The EDX and EELS analyzes by MET were performed in the STEM mode. The EDX and EEL detectors were also used for chemical composition analysis.

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (Model PHI 5400, Perkin Elmer, USA) was used for the chemical characterization of the surface of different substrates. The specimens were determined from the XPS spectrum using magnesium anode K α radiation (Photon energy: 1253.6 eV / Line width: 0.7 eV).

Surface hydrophilicity

The relative wettability of the surface was evaluated through the contact angle analysis obtained by the sessile drop method with the GBX scientific instrument. A 13 μ l drop of distilled water was instilled on the surface of a treated sample. With a camera attached to an optical microscope, photographs were taken at three different times, 1 second, 120 seconds and 180 seconds, so that, through the images obtained, contact angles were measured. The value used to compare the different samples was taken from the average between the left and right angles of each drop. The hydrophilicity test was carried out at the Molecular Encapsulation and Biomaterials Laboratory of the Chemistry Department at UFMG.

***In vitro* assays**

Cell culture assays were performed on 96-well microplates, which received three sample disks from each group, sterilized at a dose of 15 kilogram (KGy) gamma radiation. Immortalized pre-osteoblastic, calvarial cells from neonatal mice (MC3T3-E1, subclone14) were plated directly on the discs or control wells at 5×10^3 cells per well (10 μ L per well), having the volume of each one being completed to 100 μ L with osteogenic medium (American Type Culture Collection; Manassas, Virginia, USA). The osteogenic medium was changed every 2 days.

Cell viability assay - MTT

MTT tests were performed 24 hours and 7 days after cell culture. To this end, the culture medium present was aspirated into the wells of the microplate and 10 μ l of the MTT solution (5mg MTT / ml PBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) was added to each well. To the wells were added 90 μ L of culture medium without fetal bovine serum. The plate was incubated at 37 °C for 3 Hrs, protected from light. Next, the contents of the wells were aspirated and washed once with PBS solution. Subsequently, 50 μ L of DMSO (common) was added and allowed to act for 10 minutes at room temperature for dissolution of the crystals. To read, 50 μ L of each well was transferred to a new culture plate and the optical density was measured by a spectrophotometer (Spectra Max 190, Molecular devices), at the wavelength of 540 nm.¹⁰

Mineralization Testing

For the mineralization assay, the osteoblastic cells were cultured for 21 days. After this time, the wells were aspirated and washed thoroughly with PBS solution, pH 7.4, twice. The cells were then fixed with 60% isopropanol solution, diluted in distilled water, 200 μ L per well, for a period of 10 minutes in a 22 °C environment. Isopropanol

was then aspirated and the wells were washed with distilled water to rehydrate the cells. 200 µl of alizarin red (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) at the 40 mM concentration at pH 4.2 were added to each well and allowed to act for 30 minutes under gentle shaking. Subsequently, the dye was aspirated and the wells were carefully washed with distilled water until the supernatant became clear. 200µL per well of 10% acetic acid solution in distilled water plus 4: 1 methanol (acetic acid: methanol) was added and left to stir for 30 minutes. After stirring, 200µL of each well was transferred to a new culture plate and the optical density was measured by a spectrophotometer (Spectra Max 190, Molecular Devices) at the 550 nm wavelength. The reading was then performed by comparing the staining of each well with the standard dye curve, with the most concentrated point being 4000µM and the following concentrations obtained by 2-fold serial dilutions.¹¹

Morphological evaluation of osteoblast

Osteoblastic cells were cultured for 7 and 14 days. After this time, the wells were aspirated and carefully washed twice with 150 µl of 0.1 M phosphate buffer solution. The cells were then fixed with 150 µl / well of 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1M phosphate buffer and left for 24 hours at 40°C. Next, the fixative solution was removed and 150 µl of 0.1 M phosphate buffer added. The following stages of sample processing (secondary fixation with osmium tetroxide, dehydration, CO₂ critical point drying, metallization and stub assembly) were performed by the microscopy center of the Federal University of Minas Gerais. The samples were evaluated at the UFMG microscopy center using the FEG - Quanta 200 FEI scanning electron microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA), under high vacuum and with a voltage of 5 KV.

Statistical analysis

Data were expressed as means and standard deviation. The ANOVA test followed by Tukey's post-hoc test was used for statistical analysis between groups. The confidence level was 95% and 99%.

RESULTS

Surface roughness

The roughness parameters are: smooth surface ($S_a < 0.5\mu\text{m}$), minimally rough ($S_a 0.5\text{-}1\mu\text{m}$), moderately rough ($S_a > 1\text{-}2\mu\text{m}$) and rough ($S_a > 2\mu\text{m}$).¹² Figure 1 shows that the mean surface roughness of the titanium substrate (T) acquired by aluminum oxide blasting and double acid etching (HF / HNO₃) did not change significantly after the application of bioactive glass coating or deposition of the chemical compound KOH ($p > 0.05$).

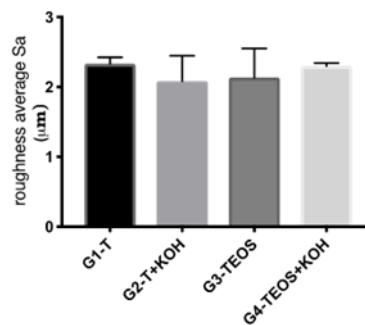


Fig. 1. Arithmetic roughness (S_a) of surfaces T, T + KOH, TEOS and TEOS + KOH. There is no statistically significant difference between groups ($p > 0.05$) (ANOVA followed by Tukey test).

Microstructural characterization of surface topography

SEM images showed, for group I (T), undulating morphology with non-regular valleys and peaks with very rough appearance (Fig. 2a, b). The surface of titanium (T + KOH) presented morphology with more defined valleys and peaks, with very rough aspect (Fig. 2c, d). The surface covered with bioactive glass (TEOS) presented a heterogeneously rough appearance, as it presents regions with high frequency of peaks and valleys mixed with flat surfaces with vitreous aspect, derived from cracking microplates. The presence of pores can be seen in a 40000x magnification.(Fig. 2e, f). The surface covered with bioactive glass (TEOS + KOH) was similar in appearance to the TEOS group but exhibited greater cracking (Fig. 2g, h).

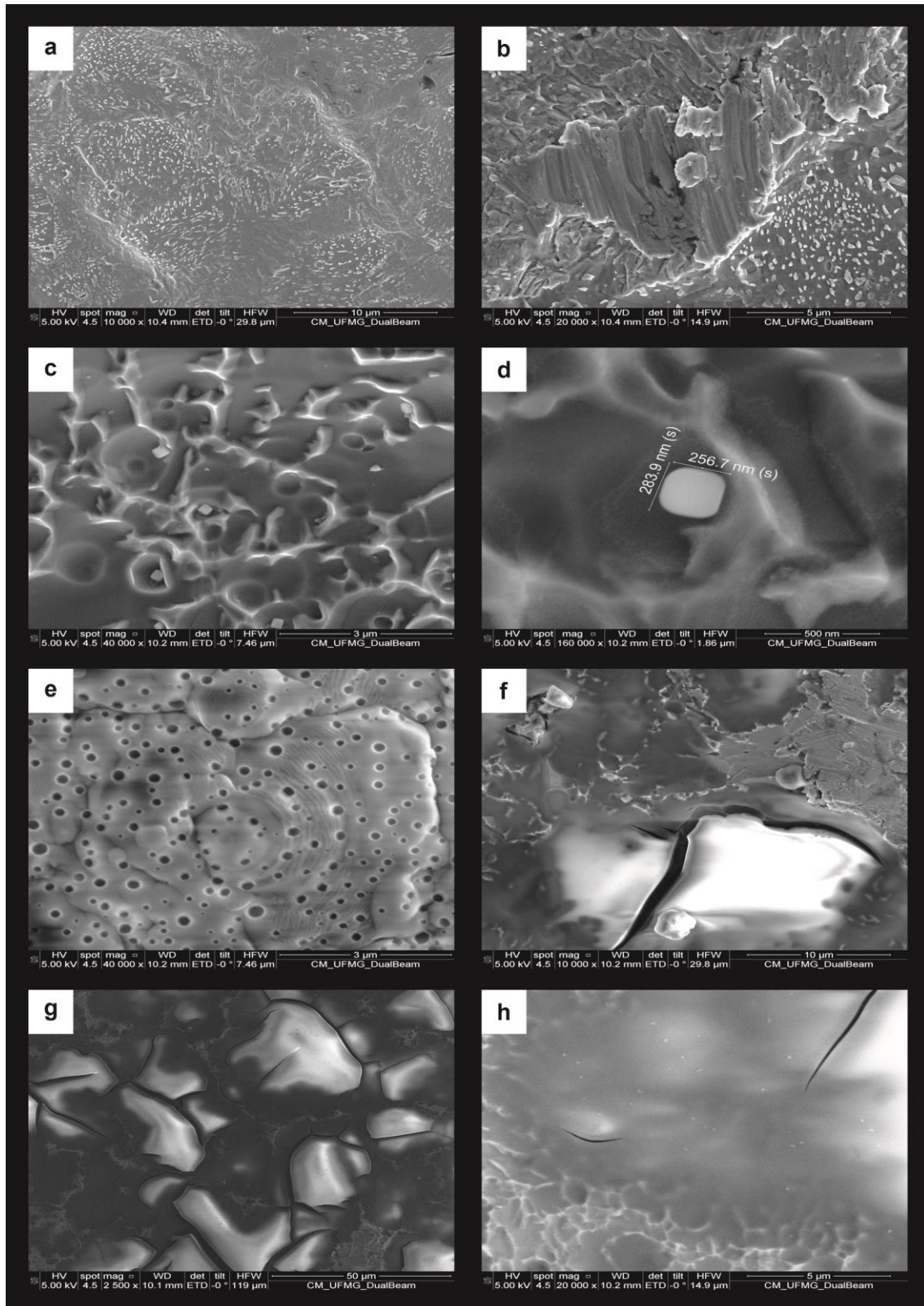


Fig. 2. Surface topography images taken by SEM in groups T (a, b), T + KOH (c, d), TEOS (e, f) and TEOS + KOH (g, h).

Hydrophilicity Test

Figure 3a shows the decrease in the contact angle formed between the distilled water drop and the sample surface, measured at times of 1, 120 and 180 seconds.¹³ Note that in all groups, the reduction occurred continuously, almost linearly, over time. Figure 3b shows the mean contact angle and indicates that all surfaces are moderately hydrophilic, with the group (T + KOH) showing greater hydrophilicity, but not statistically different from the other groups ($p > 0.05$).



Fig. 3. (a) Contact angle measured at times 1, 120 and 180 seconds. (b) Average contact angle of T, T + KOH, TEOS and TEOS + KOH groups. ANOVA - Tukey's multiple comparisons test ** $p > 0.05$

Analysis of bioactive glass coating thickness and chemical composition of surfaces

TEM analyzes of samples without bioactive glass from groups (T) and (T + KOH) show predominantly Ti signal on the surface of the titanium substrate, as well as Si signal (Fig. 4a and b, respectively). The Ga signal is due to the gallium ions that are implanted in the sample during focused ion beam lamellae preparation process. The Cu signal comes from secondary X-rays generated from the interaction of backscattered electrons on the polar part of the transmission microscope objective lens and which excites copper X-rays from the specimen holder. The EDX spectra show the elemental composition at the interface between the titanium substrate and the focused ion beam platinum (point 1 indicated in the images a and b). The thickness and chemical composition of the bioactive glass that covered the titanium substrates were analyzed by TEM. The TEOS group had an average thickness of 7.55nm (Figure 4c) and the TEOS + KOH group, 90.36 nm (Figure 4d). In a qualitative analysis by EELS, Si and Ti contents were evaluated along an inline profile, perpendicular to the orientation of the bioactive glass. Results are shown in Figures 4c and d. The results show that the Si signal only comes from the region identified as bioactive glass in the TEM images.

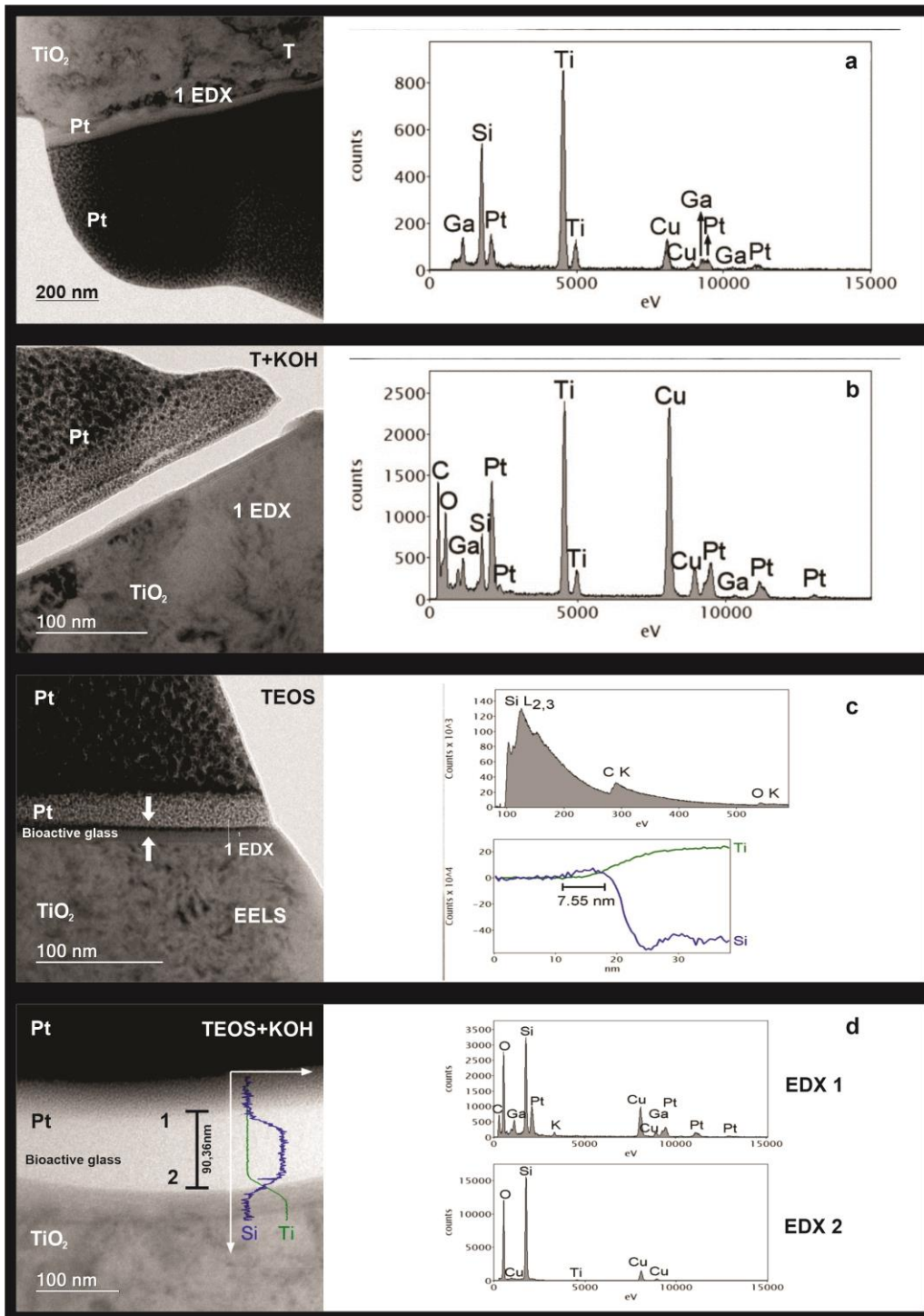


Fig. 4. TEM images. T (a) and T + KOH (b) group slides and EDX spectra related to the "1 EDX" points listed in images a and b. Group sample TEOS (c), EEL spectrum of bioactive glass made at point 1 shown in the image on the left and EELS Si and Ti signal count profile along the line perpendicular to the bioactive glass shown in the image on the left. Group sample TEOS + KOH (d) showing the signal count profile of Si and Ti by EELS along the line perpendicular to the bioglass and EDX spectra of points 1 and 2 shown in the image on the left.

X-ray Excited Photoelectron Spectroscopy (XPS)

In the chemical analyzes carried out on the surfaces of group T (figures 2a and b), it was possible to adjust two Gaussian peaks, at 458.24 eV and 463.84 eV, which correspond to TiO_2 and add up to 82% of the titanium in the sample and two more peaks, at 457 eV and 461.61 eV, which represent Ti_2O_3 (18% of the total titanium in the sample)¹⁴ (Figure 5a). In figure 5b it is possible to observe the high resolution spectrum in the carbon energy range (C1s), which has a peak measured at 284.9 eV, one shoulder at 288.6 eV and another at 282.29 eV. The adjustment required 4 Gaussians. At 282.71 eV, it is possible to observe a Gaussian peak that represents bonds in the form of carbide, possibly SiC (about 4% of the total carbon on the sample surface).¹⁵ The Gaussian peak located at 285.00 eV represents links between carbon-nitrogen and carbon-carbon (70% of the carbon present in the sample). At 286.67 eV, there is a Gaussian peak that represents the carbon-oxygen-hydrogen bond (18% of the carbon available on the sample surface). The Gaussian peak located at 288.66 eV confirms the presence of bonds of the type COOR and / or CaCO_3 (8% of the total carbon of the sample).

In the T + KOH group, in the oxygen energy range (O1s) (figure 5c), it is possible to observe that there is the doublet with the same components previously observed in the Ti group. 57% of the oxygen is in the form of TiO_2 , 24% of the oxygen available on the sample surface is bound to the silicon under in the form of SiO_2 or some other oxidation state, 5% of the oxygen is in the form of Ti_2O_3 and / or C = O bonds and 14% in the form of carbon-oxygen-hydrogen bonds. In the energy range of carbon 1s (figure 5d), most of the carbon in the sample surface T + KOH (90% of the total carbon in the sample) represents contamination due to exposure to the atmosphere. If these contaminations are disregarded, it is estimated that about 3% of the sample is composed of SiO_2 , 17% of some intermediate phase SiO_x ¹⁶, 1% of the sample surface is formed by silicon carbide, 54% of the surface of the sample is formed by the TiO_2 phase, less than 4% by the Ti_2O_3 phase. 13% of the sample surface is composed of carbon-oxygen-hydrogen bonds and there is possibly a trace of CaCO_3 .

Figures 5e, f, g and h show the high resolution spectrum in the silicon 2p, oxygen (O1s), carbon 1s and titanium 2p energy range, respectively, for the TEOS surface. About 77% of the sample is estimated to be SiO_2 (or some SiO_x phase)¹⁷ 12% of the sample surface is TiO_2 (along with the Ti_2O_3 phase).

Figure 5i and j show the high resolution spectrum in the oxygen (O1s) and silicon 2p energy range, respectively, for the TEOS + KOH surface. About 58% of the sample is estimated to be SiO_2 or some intermediate SiO_x phase¹⁷, 2% of the sample surface is silicon carbide, 10% of the sample surface is TiO_2 , 12% Ti_2O_3 .

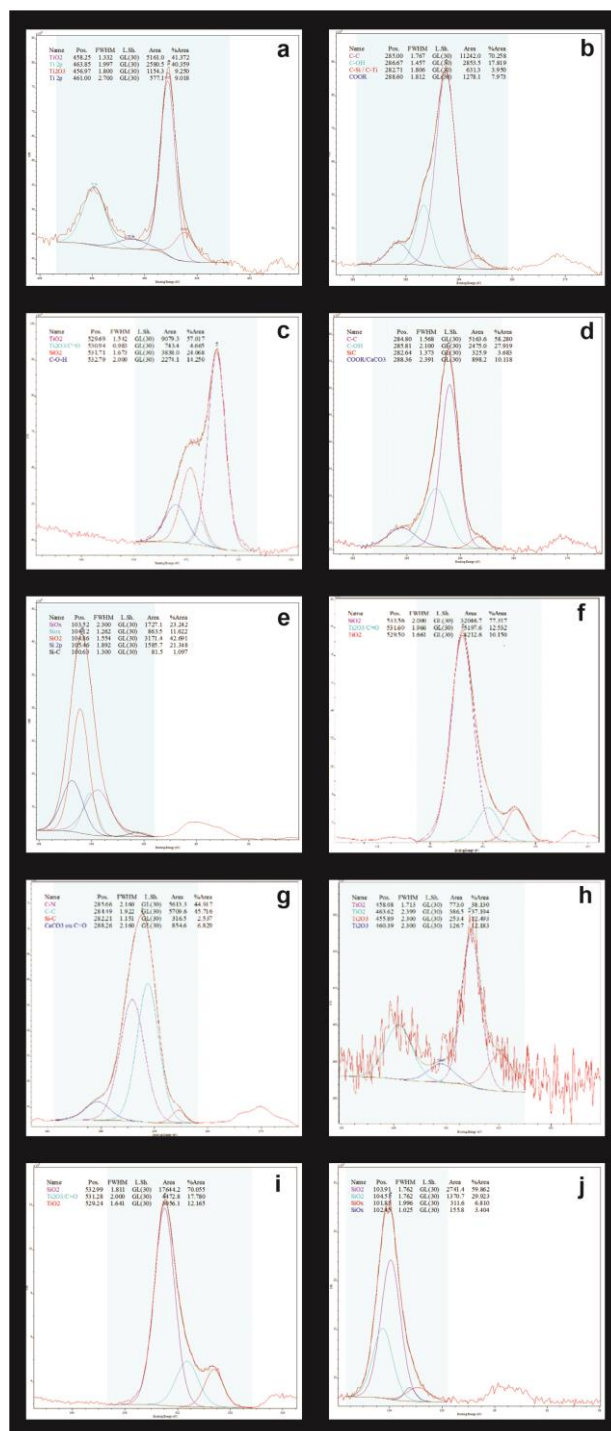


Fig 5. (a) High resolution XPS spectrum of the Ti sample in the 2p titanium energy range. (b) High resolution XPS spectrum of the Ti sample in the 1s carbon energy range. (c) High resolution XPS spectrum in the 1s oxygen energy range of the Ti + KOH sample. (d) High resolution XPS spectrum in the 1s carbon energy range of the Ti + KOH sample. (e) High resolution XPS spectrum of the TEOS sample in the 2p silicon energy range. (f) High resolution XPS spectrum in the 1s oxygen energy range of the TEOS sample. (g) High resolution XPS spectrum in the energy range of carbon 1s of the TEOS sample. (h) High resolution XPS spectrum in the titanium 2p energy range of the TEOS sample. (i) High resolution XPS spectrum in the 1s oxygen energy range of the TEOS + KOH sample. (j) High resolution XPS spectrum in the 2p silicon energy range of the TEOS + KOH sample.

Cell Viability Test (MTT)

The viability of osteoblastic cells was assessed by MTT assay in two distinct periods: 24 hours and 7 days (Figures 6a and 6b, respectively). The production of formazan MTT given by absorbance reveals the number of viable cells in the different groups. In both assays, it is observed that the presence of the disks alone created a less viable environment for the cells than the control medium without disks. Looking at the tests separately, it is possible to report that within 24 hours there was a statistically significant difference between the T and TEOS + KOH groups, with the TEOS + KOH group showing lower cell viability. There was no statistical difference when comparing the other groups in the same period. When analyzing the 7-day period, no statistical difference was observed between the groups. When comparing the absorbance level between the tests, 24 hrs and 7 days, a significant increase in cell viability was observed in all groups.

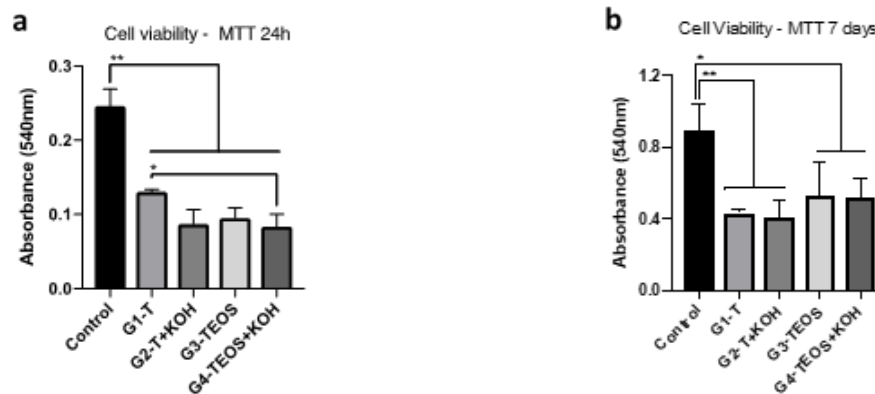


Fig. 6. Cell viability of osteoblasts cultured at 24 hours (a) and 7 days (b) in the control groups, T, T + KOH, TEOS and TEOS + KOH, measured in absorbance. ANOVA - Tukey's multiple comparison test: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Mineralization Test (Alizarin)

The production of mineralization nodules in the bone matrix was evaluated by the alizarin red assay after 21 days of culture. Mineralization results are given by dye concentration in μM (Figure 7). The TEOS + KOH group presented the highest concentration of mineralization nodules, but differed statistically only from the control groups (without disks) and T. All groups presented significantly higher mineralization nodule production than group T, except for the TEOS group, which, despite higher production, showed no significant difference.

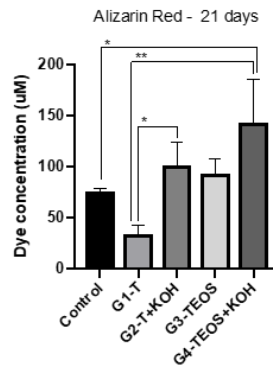


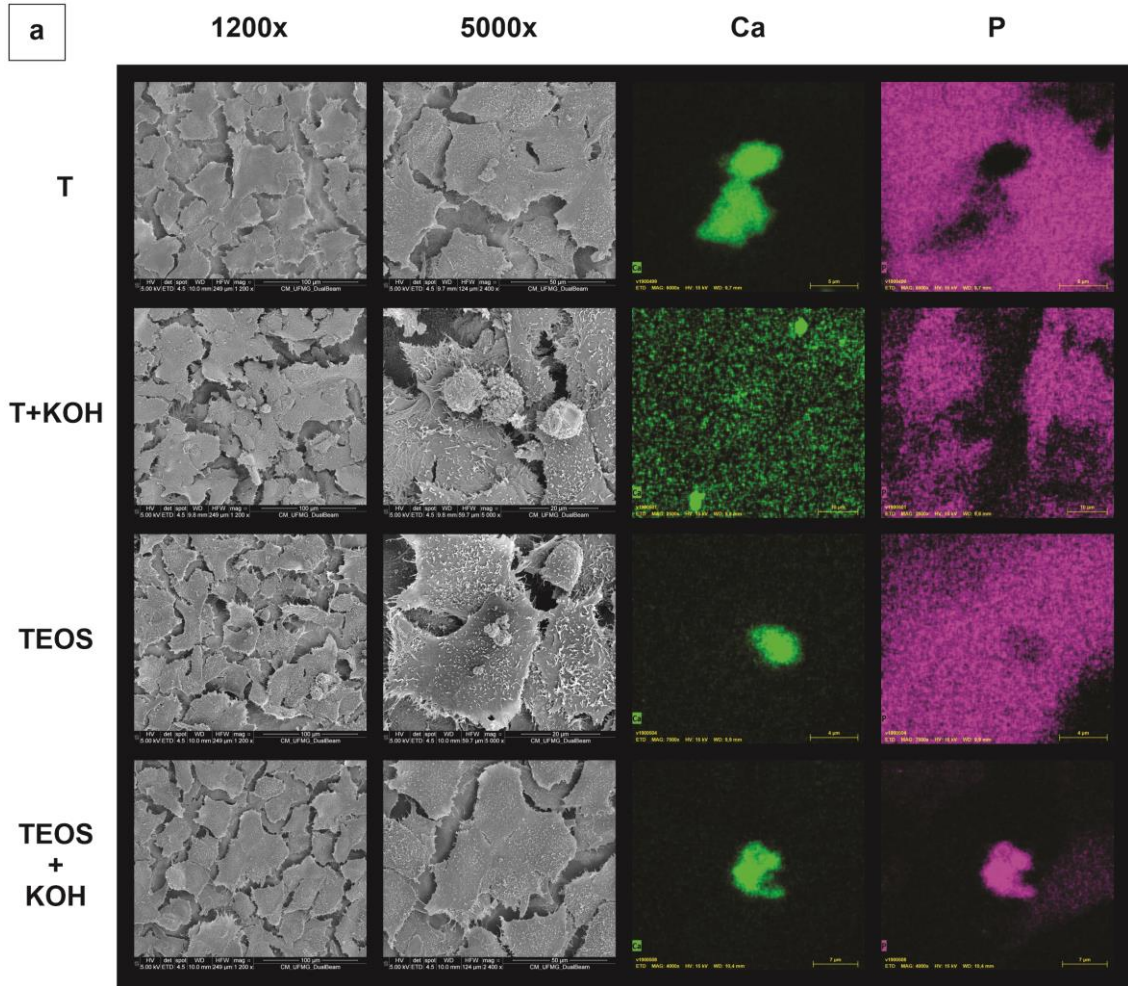
Fig. 7. Mineralization of the matrix, stained with alizarin red (dye concentration in μM) after 21 days of osteoblast culture in groups T, T + KOH, TEOS and TEOS + KOH. ANOVA - Tukey's multiple comparison test: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Images of cell morphology and calcification nodules with their chemical analysis by EDX.

Images of osteoblastic cell morphology and calcification nodules were performed by SEM after 7 and 14 days of cell culture, in addition to chemical analysis of nodules by EDX.

The images taken after 7 days of culture (Figures 8a and b) showed similarity between the groups regarding cell concentration, intercellular spacing and polygonal morphology. At 5000X magnification, some small mineralization nodules are observed in all groups, confirmed by the presence of calcium peak in EDX mapping. Analyzing the chemical composition by map and EDX images, we can see that the nodules formed in the T, T + KOH and TEOS groups are exclusively calcium, whereas the nodules formed in the TEOS + KOH group are composed of calcium and phosphorus.

After 14 days of culture (Figures 9a and b), in all groups, there is practically no intercellular spacing. A compact cell mass permeated by many calcification nodes interlaced by cytoplasmic extensions forms the extracellular bone matrix. In SEM images, the TEOS and TEOS + KOH groups are differentiated by the large presence of superficial nodules, that is, on the cell layer, with some cells interspersed. In the EDX images, it can be seen that all groups present in the formation of their nodules the chemical elements calcium and phosphorus in large quantities, however, again, a greater highlight is for the TEOS and TEOS + KOH groups, due to the larger number of nodules and the strong presence of calcium and phosphorus. In the analysis of the EDX map, in all groups, there is an accentuation of the calcium peak and the distinction of the phosphorus peak in relation to the osmium, an element present in the fixative solution.



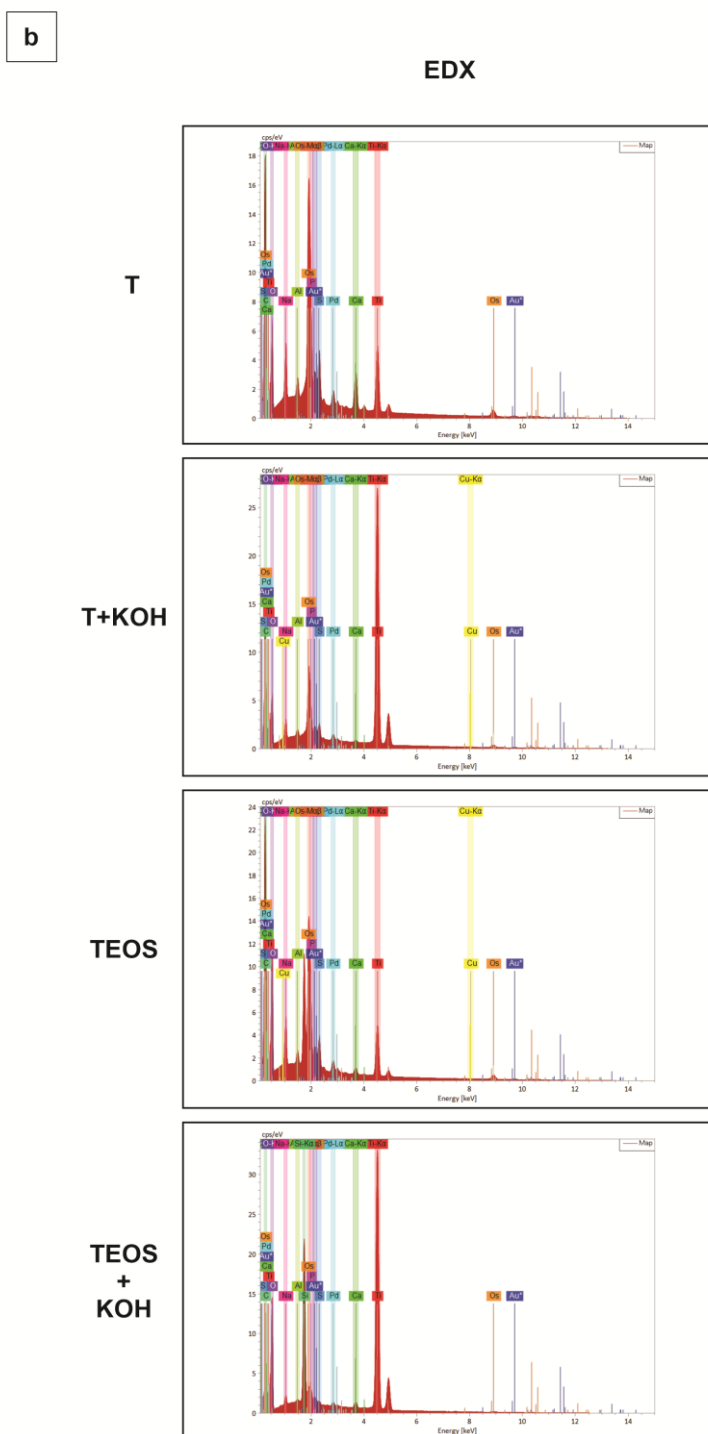
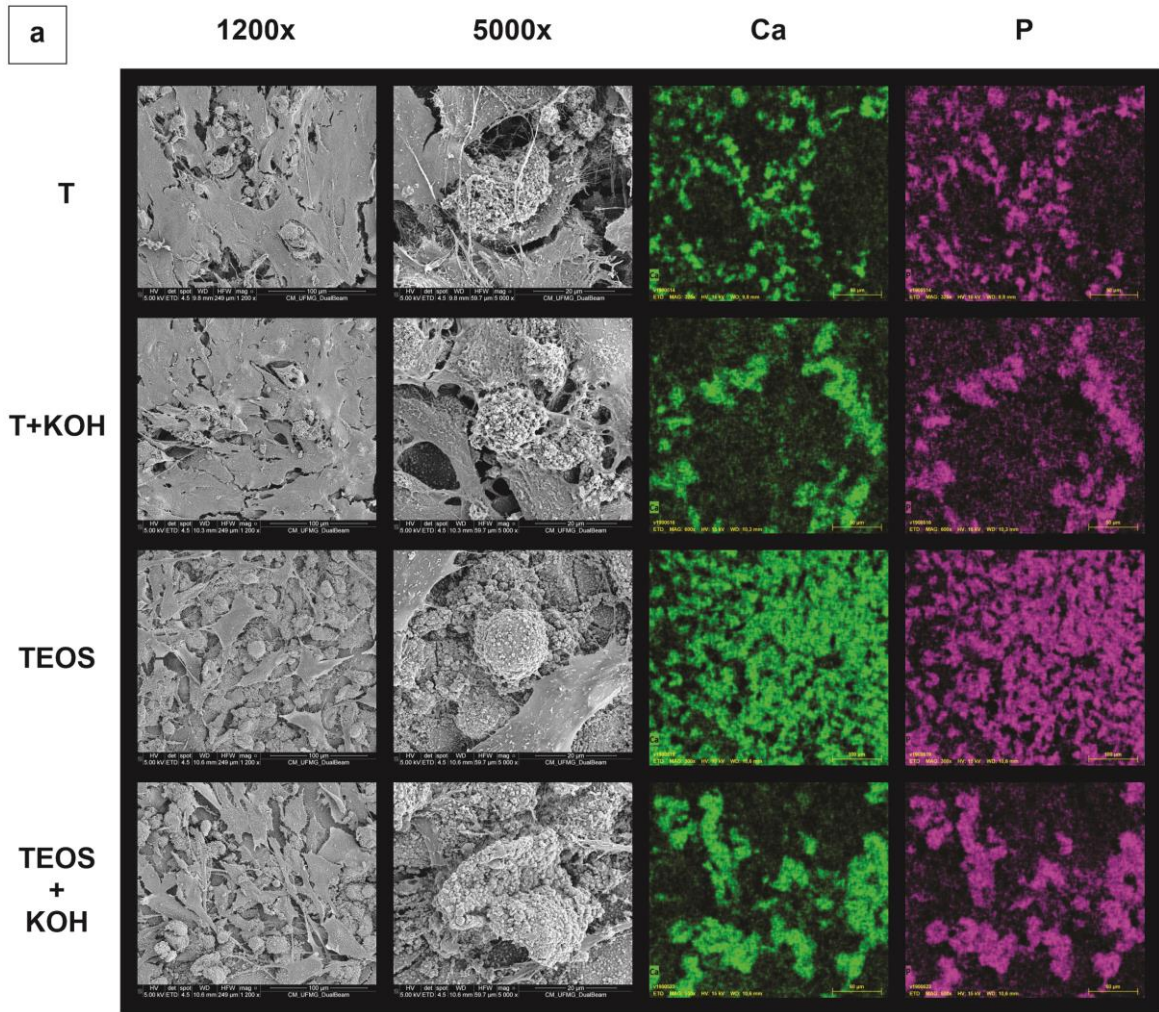


Figure 8. 7 days of cell culture. (a) Cell morphology images (1200x and 5000x), EDX images (calcium and phosphor) and (b) chemical map (EDX). Groups T, T+KOH, TEOS and TEOS+KOH.



b

EDX

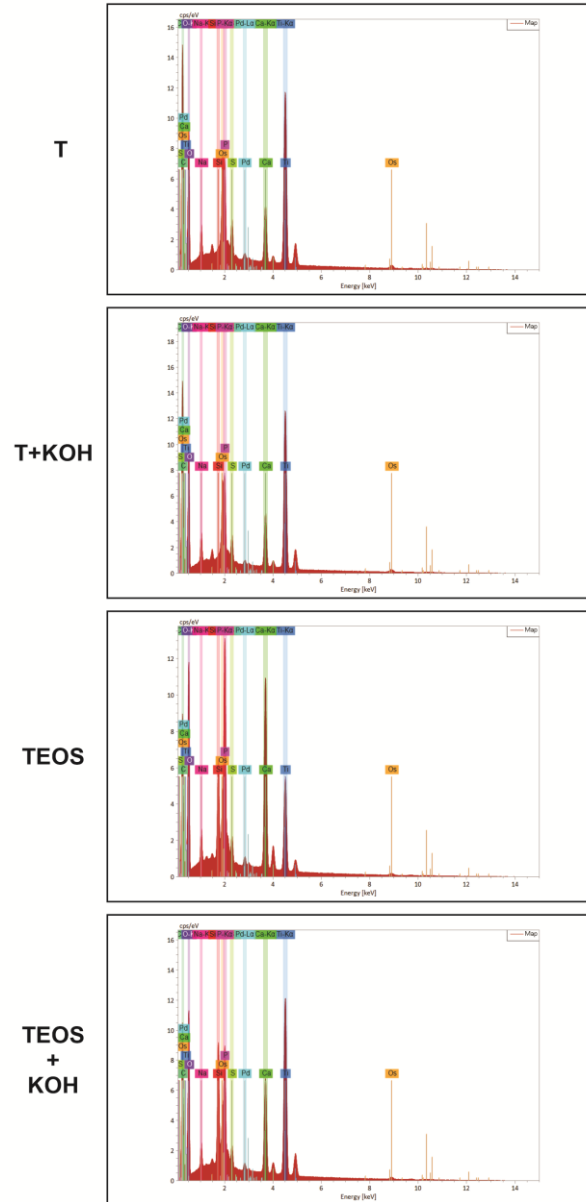


Figure 9. 14 days of cell culture. (a) Cell morphology images (1200x and 5000x), EDX images (calcium and phosphor) and (b) chemical map (EDX). Groups T, T+KOH, TEOS and TEOS+KOH.

DISCUSSION

The magnification of the images for microstructural characterization of the surface topography was purposely individualized for each case, aiming to show the main characteristics of each surface. As the structural dimensions are variable, the standardization of magnification would cause damages in detailing structural characteristics in different surfaces.

Several attempts have been made to characterize the composition of the cuboidal geometry precipitates at the bottom of the wells (Figs. 2c and 2d), but the energy used for analysis in EDX or XPS causes the precipitate to be destroyed and evaporated, making its analysis impossible by the methods used. Another possible explanation for the impossibility of analyzing the KOH precipitates may be due to the low concentration of the precipitates on the samples surface. Hydrophilicity was not a determining factor for sample qualification. Although the results did not show significant difference, the tendency for a higher group II surface hydrophilicity (T + KOH) did not contribute to a better cellular response.

When analyzing 24-hour MTT assays, all surfaces that received some type of compound on the titanium substrate (T + KOH, TEOS and TEOS + KOH) tended to perform worse than the pure titanium (T) substrate, which can be understood as a delay effect for cell adhesion, multiplication and differentiation. In the 7-day trial, the physical and chemical factors present in the bioactive glass-coated groups (TEOS and TEOS + KOH) stood out positively on uncoated surfaces.

These findings corroborate the studies by Surmenev, Surmeneva and Ivanova (2014)¹⁸, who report that the cellular response to the biomaterial incorporated to the titanium surface is influenced by some inherent surface properties, such as chemical composition, roughness, crystallinity, surface energy, hydrophilicity, among others. These characteristics directly influence the behavior of osteogenic cells, as they modify the adsorption of proteins that mediate cell surface interaction.¹⁴ According to Hench (2009), the expression of bone cell genes is dose dependent and has an optimal level of expression within a specific solubility rate for each ion.¹⁹

The mean surface roughness (Sa) of all groups was close to the moderate roughness ($2 > Sa > 1$), stipulated by Wennerberg and Albrektsson, (2009) as the best roughness pattern for cell stimuli.¹² Although there is no statistical difference between the groups, surfaces with the same roughness may have different biological responses. This is because the different methods used to create a moderately rough surface unintentionally produce changes in nanotopography and chemical composition. Although the groups of the present study obtained similar results of surface micro-roughness, regardless of the type of coating applied on the surface and its chemical peculiarities, the biological responses could already be different only by the changes generated in the nanometric topography.

However, this study compares chemically modified surfaces, which would make it impossible to make isolated comparisons of the efficiency of the topographic aspect between the groups.

The TEOS and TEOS + KOH groups were coated with innovative and patented bioactive glass, with the differential of their synthesis, a solgel compound, which goes through polymeric reactions of chemical precursors at room temperature to form a gel that transforms into a glass network at low temperatures, not going through the sintering process. Glasses produced by the sol-gel method have lower bond connectivity when compared to glasses derived by the fusion method. This reduction in network connectivity in combination with its inherent nanoporosity explains why glasses produced by the sol-gel method can be bioactive with up to 90 mol% silica, while fusion-derived glasses are limited to 60 mol%.³ According to LIN et al. (2009), the OH content in sol-gel glass depends on the conditions used in synthesis, such as final stabilization or sintering temperature. The sintering of glass by the sol-gel method above its transition temperature causes a reduction in porosity and densification of the silica mesh. The sintering temperature should be kept below the crystallization temperature for the glass to avoid the formation of a ceramic glass.⁷

The TEOS and TEOS + KOH groups presented cracks in their surfaces. Bioactive glass synthesized via the TEOS chemical precursor passes through the formation of a wet gel due to excess water from the reagents and the alcohol and water resulting from the hydrolysis and condensation reaction process. As water and alcohol evaporate during drying, they leave a network of pores that crack due to the shrinkage that occurs during drying and evaporation of the liquid by-products of the condensation reaction. When pore liquid is removed from the gels, vapor travels from inside the gel to the surface through the network of interconnected pores. This can cause capillary stress within the pore network and thus cracking (Figure 2e). Despite the appearance of cracks in the bioactive glass coverings, cell growth was not disturbed after 7 or 14 days of morphological evaluation, and was similar and even greater in relation to surfaces that did not receive bioactive glass cover, probably because the cracks and their increase is related to the ionic dissolution of bioactive glasses and the direct effect on osteoblast gene expression.

The groups that received deposition of the chemical potassium hydroxide, T + KOH and TEOS + KOH, showed no signs of potassium presence in the XPS, EDX or ELLS analysis, probably due to the low concentration on the surface. The only finding of the presence of the basic compound could be made by the differentiated visualization of cubic precipitates and white dots in the SEM images (Figures 2 c, d, h).

The addition of potassium hydroxide (KOH) to the surface of Titanium and TEOS showed better mineralization results than the respective groups without KOH. According to the works of Jones (2012), the ionic dissociation of the KOH with consequent release of the OH⁻ group leads to the attack of Si-O-Si glass silica bonds, favoring the

formation of silanol (SiOH) and deposition of Ca^{+2} and PO_4^{-3} groups on the surface.² This work also corroborates the studies by Li et al. (1994) who showed that on negatively charged surfaces, such as silica and titanium, HCA precipitation occurred, and the same was not true for positive surfaces such as alumina. One of the causes would be silanol density (SiOH) and velocity. that the substrate would be hydrolyzed and dissolved to release SiOH on its surface. Clearly, apatite formation is associated with negatively charged surfaces, as well as the abundance of solution-released OH groups.²⁰

XPS analysis shows that for the TEOS and TEOS + KOH groups, the highest concentration is of silicon dioxide (SiO_2) compound, expected to be the main component of bioactive glass. XPS analyzes showed the presence of Si contamination in the T and T + KOH samples, which could not be visualized by EDX.

7-day cell morphology analyzes by SEM images show aspects consistent with MTT assay results (7 days). From the images, there is no difference in the groups regarding cell settlement, distance between cells, morphology and adherence, which leads us to the results of statistic Regarding the production of mineralization nodules shown by SEM and EDX, a different condition is observed for the TEOS + KOH group within 7 days. This is because the chemical analysis by EDX showed that exclusively in these groups, the formed nodules presented calcium and phosphorus in their composition. It is likely that the production of free phosphorus by the alkaline phosphatase enzyme activity occurred early in this group.al indifference for cell viability.

Associated with this condition, it is known that free phosphorus production by enzymatic activity of alkaline phosphatase induces osteopontin RNA. Osteopontin is a phosphorylated glycoprotein secreted by osteoblasts for mineralization of the extracellular matrix. The relationship between osteopontin expression levels and phosphate levels, combined with osteopontin's ability to regulate calcium, suggests that the calcium transport function attributed to osteopontin occurs under conditions of high cellular phosphate levels.²¹ These reports corroborate the results of this study, which show a correlation between the alizarin assay (21 days) and the calcium and phosphorus concentration in the mineralization nodules, visualized by EDX at 7 days. Probably the early addition of phosphorus in the TEOS + KOH group is related to the most significant results for alizarin assays.

The best results for the mineralization assay in the bioactive glass-coated groups compared to the T group (Fig. 7) suggest a favorable ion dissolution to the cellular genetic stimuli for bone matrix mineralization by osteoblasts.²² Another important consideration is associated with the better mineralization results of the TEOS + KOH group compared to TEOS (Fig.7). A hypothesis to explain these better mineralization results may be associated with the increase of OH^- group concentration by KOH dissociation probably generated the attack of the silica bonds of the glass, leaving more silanol (SiOH) at the glass-solution interface. Then, groups migrated from the solution to the

surface, forming a amorphous $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ rich film. Finally, incorporation of carbonate and hydroxyl groups from the solution and crystallization of $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ film to HCA.^{1,2,23}

CONCLUSION

The tested surfaces were viable and non-cytotoxic for MC3T3 osteoblastic cell growth. The addition of the KOH group on the pure titanium (T) or bioactive glass (TEOS) surfaces generated a tendency for better results for mineralization. Groups covered with bioactive glass (TEOS, TEOS + KOH) tended to outperform even groups with titanium substrate (T, T + KOH). The production of mineralization nodules in the bone matrix evaluated by the alizarin red assay showed that the addition of the two factors, bioactive glass and KOH, on the same pure titanium substrate generates the best results for the mineralization process.

FUNDING

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This research was supported by grants from Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG;APQ-01837-16).

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

REFERENCES

1. Hench LL, Polak JM, Xynos ID, Buttery LDK. Bioactive materials to control cell cycle. *Mater Res Innov* 2000; 3: 313–323.
2. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater* 2015; 23: S53–S82.
3. Pereira MM, Clark AE, Hench LL. Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface. *J Am Ceram Soc* 1995; 78: 2463–2468.
4. Martin RA, Yue S, Hanna JV, Lee PD, Newport RJ, Smith ME, Jones JR. Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* 2012; 370: 1422–1443.
5. Mercier C, Follet-Houttemane C, Pardini A, Revel B. Influence of P2O5 content on the structure of SiO2-Na2O-CaO-P2O5 bioglasses by ²⁹Si and ³¹P MAS-NMR. *J Non Cryst Solids* 2011; 357: 3901–3909.
6. Labbaf S, Tsigkou O, Müller KH, Stevens MM, Porter AE, Jones JR. Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro. *Biomaterials* 2011; 32: 1010–1018.
7. Lin S, Ionescu C, Pike KJ, Smith ME, Jones JR. Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass. *J Mater Chem* 2009; 19: 1276.
8. Domingues RZ, Clark AE, Brennan AB. A sol-gel derived bioactive fibrous mesh. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 468-474.
9. B. Federativa, D.O. Brasil, Carta patente n° pi 0200698-7, 901 (2018).
10. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; 94: 57–63.
11. Lin TH, Sen Yang R, Tang CH, Wu MY, Fu WM. Regulation of the maturation of osteoblasts and osteoclastogenesis by glutamate. *Eur J Pharmacol* 2008; 589: 37–44.
12. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: 172-184
13. Ponsoonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, Martelet C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cel behavior. *Materials Science and Engineering C* 2003; 23: 551-560.
14. Masiala TM, Bantu AKM, Bakambo GE, Lunguya JM, Kanza JLK, Muamba OM. Influence of pH

- Preparation on the Photo-Response of Electrodeposited Titanium Dioxide (TiO₂) Thin Films. *International Journal of Materials Science and Applications*. 2016; 5: 207-213.
15. Wang YY, Kusumoto K, Li C-J. XPS Analysis of SiC Films Prepared by Radio Frequency Plasma Sputtering. *Physics Procedia*. 2012; 32: 95-102.
 16. Flink A, Beckers M, Sjöln J, Larsson T. The location and effects of Si in (Ti_{1-x}Si_x)N_y thin films. *J Mater Res* 2009; 24: 2483-2498.
 17. Ulgut B, Suzer S. XPS Studies of SiO₂/Si System under External Bias. *J Phys Chem B* 2003; 107, 13: 2939-2943.
 18. Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis - A review. *Acta Biomater* 2014; 10: 557-579.
 19. Hench LL. Genetic design of bioactive glass. *J Eur Ceram Soc* 2009; 29: 1257-1265.
 20. Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, De Groot K. The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants. *J Biomed Mater Res* 1994; 18: 7-15.
 21. Beck GR, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 8352-8357.
 22. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011; 32: 2757-2774.
 23. Clark AE, Hench LL, Science M. The Influence of Surface Chemistry on Implant Interface Histology : A Theoretical Basis for Implant Materials Selection. *J Biomed Mater Res* 1976; 10: 161-174.

REFERÊNCIAS

ALFARSI, M.A.; HAMLET, S.M.; IVANOVSKI, S. Titanium surface hydrophilicity modulates the human macrophage inflammatory cytokine response, **J. Biomed. Mater. Res.**, v.102, n. 1, p.60–67, 2014.

ALVES, E.G.L. *et al.* Effect of the Ionic Product of Bioglass 60s on Osteoblastic Activity in Canines. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2015.

ANITUA, E. *et al.* Effects of Calcium Ions on Titanium Surfaces for Bone Regeneration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 173–81, 2015.

BALLARRE, J. *et al.* Improving the Osteointegration and Bone-Implant Interface by Incorporation of Bioactive Particles in Sol-Gel Coatings of Stainless Steel Implants. **Acta. Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1601–9, 2010.

BECK, G. R.; ZERLER, B.; MORAN, E. Phosphate Is a Specific Signal for Induction of Osteopontin Gene Expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 15, p. 8352–57, 2000.

BLOYER, D. R. *et al.* Stress-Corrosion Crack Growth of Si-Na-K-Mg-Ca-P-O Bioactive Glasses in Simulated Human Physiological Environment. **Biomaterials**, v. 28, n. 33, p. 4901–11, 2007.

BOHNER M. Silicon-substituted calcium phosphates - A critical view. **Biomaterials**, v.30, n. 32, p. 6403–6, 2009.

BRANEMARK, P.I. Osseointegration and its experimental background. **J. Prosthet. Dent.**, v. 50, n. 3, p. 399-410, 1983.

CARVALHO, S. *et al.* Comparative Effect of the Ionic Products from Bioactive Glass Dissolution on the Behavior of Cementoblasts, Osteoblasts, and Fibroblasts. **Key Engineering Materials**, v. 396–398, p. 55–59, 2009.

CLARK, A.E.; HENCH, L.L.; SCIENCE, M. The Influence of Surface Chemistry on Implant Interface. **Histology : A Theoretical Basis for Implant Materials Selection** v. 10, n. 2, p. 161–74, 1976.

DEDAVID, B.A., GOMES C.I., MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de**

Varredura: aplicação e preparação de amostras. 1.ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

DOMINGUES, R. Z.; CLARK, A. E; BRENNAN, A. B. A Sol-Gel Derived Bioactive Fibrous Mesh. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 55, p. 468–474, 2001.

DRNOVŠEK, N. *et al.* Bioactive Glass Enhances Bone Ingrowth into the Porous Titanium Coating on Orthopaedic Implants. **International Orthopaedics**, v. 36, n. 8, p. 1739–45, 2012.

ELLINGSEN, J. E. A Study on the Mechanism of Protein Adsorption to TiO₂. **Biomaterials**, v. 12, n. 6, p. 593–96, 1991.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Rosana Zacarias Domingues; Ângela Leão Andrade. **Processo para obtenção de um revestimento bioativo de fosfato de cálcio sobre substratos sólidos**. PI 0200698-7 ,14 fev. 2018.

FOPPIANO, S. *et al.* The Influence of Novel Bioactive Glasses on in Vitro Osteoblast Behavior. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. *Part A* 71, n. 2, p. 242–49, 2004.

FOPPIANO, S. *et al.* Bioactive Glass Coatings Affect the Behavior of Osteoblast-like Cells. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 5, p. 765–71, 2007.

GAVIRIA, L. *et al.* Current Trends in Dental Implants. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 40, n. 2, p. 50, 2014.

GERLIER, D.; THOMASSET N. Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 94, n. 1–2, p. 57–63, 1986.

GOMEZ-VEGA, J.M.*et al.* Novel Bioactive Functionally Graded Coatings on Ti6Al4V. **Advanced Materials**, v. 12, n. 12, p. 894–98, 2000.

HENCH, L. L. A Genetic Theory of Bioactive Materials. **Bioceramics**, v. 192, n. 1, p. 575–580, 2000.

HENCH, L. L. *et al.* Analysis of Bioglass Fixation of Hip Prostheses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 11, n. 2, p. 267–82, 1977.

HENCH, L. L.; PASCHALL, H. A. Direct Chemical Bond of Bioactive Glass-ceramic Materials to Bone and Muscle. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 7, n. 3, p. 25–42, 1973.

HENCH, L. L. *et al.* Bioactive Materials to Control Cell Cycle. **Materials Research Innovations**, v. 3, n. 6, p. 313–23, 2000.

HENCH, L. L. The Story of Bioglass®. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 11, p. 967–78, 2006.

HENCH, L. L. Genetic Design of Bioactive Glass. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p.1257–65, 2009.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N.S.; BOCCACCINI, A.R. A Review of the Biological Response to Ionic Dissolution Products from Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757–74, 2011.

JONES, J.R. Reprint of: Review of Bioactive Glass: From Hench to Hybrids. **Acta Biomaterialia**, v. 23, p. 53–82, 2015.

JONES, J.R. Review of Bioactive Glass; from Hench to Hybrids. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 4457–86, August, 2013.

KEETING, P.E. *et al.* Zeolite A Increases Proliferation, Differentiation, and Transforming Growth Factor. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 11, p. 1281–89, 1992.

KOOTEN, T.G.V. *et al.* Influence of Substratum Wettability on the Strength of Adhesion of Human Fibroblasts. **Biomaterials**, v. 13, n. 13, p. 897–904, 1992.

KOPF, B.S.; RUCH, S.; BERNER, S.; SPENCER, N.D.; MANIURA-WEBER, K. The role of nanostructures and hydrophilicity in osseointegration: In-vitro protein-adsorption and blood-interaction studies, **J. Biomed. Mater. Res.**,v. 103, p. 2661–2672, 2015.

LAVOS-VALERETO, I.C. *et al.* Evaluation of the titanium Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating on growth and viability of cultured osteoblast-like cells. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 8, p. 900-5, 2002.

LI, R. Sol-Gel Processing of Bioactive Glass Powders. 1991. 2: 231–39. PhD Dissertation, University of Florida, 1991.

LI, P.; OHTSUKI C.; KOKUBO T.; NAKANISHI K.; SOGA N.; DE GROOT K. The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 18, p. 7–15, 1994.

LIM, Y.J. *et al.* Surface Characterizations of Various Treated Titanium Materials. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.16, n.3, p. 333–42, 2001.

LIMBORÇO, H. **Calcogenetos fotovoltaicos: pontos quânticos, nanofios e filmes finos**, 11 de maio de 2017, Departamento de Física - UFMG.

LIN, S. *et al.* Nanostructure Evolution and Calcium Distribution in Sol–gel Derived Bioactive Glass. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1276, 2009.

LIN, T.H. *et al.* Regulation of the maturation of osteoblasts and osteoclastogenesis by glutamate. **European Journal of Pharmacology**, v. 589, p. 37-44, 2008.

MAENO, S. *et al.* The Effect of Calcium Ion Concentration on Osteoblast Viability, Proliferation and Differentiation in Monolayer and 3D Culture. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4847–55, 2005.

MARTIN, R. A. *et al.* Characterizing the Hierarchical Structures of Bioactive Sol-Gel Silicate Glass and Hybrid Scaffolds for Bone Regeneration. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 370, n. 1963, p. 1422–43, 2012.

MERCIER, C. *et al.* Influence of P₂O₅ content on the Structure of SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅ bioglasses By ²⁹Si And ³¹P MAS-NMR. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 357, n. 24, p. 3901–9, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NOVAES JR, A.B. *et al.* Influence of Implant Surfaces on Osseointegration. **Braz. Dent. J.**, v. 21, n. 6, p. 471–81, 2010.

OIRSCHOT, B.A.J.A.V *et al.* In Vivo Evaluation of Bioactive Glass-Based Coatings on Dental Implants in a Dog Implantation Model. **Clinical Oral Implants Research**, v. 25, n. 1, p. 21–28, 2014.

PEREIRA, M.M., CLARK A.E., AND HENCH, L.L. Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 78, n. 9, p. 2463–68, 1995.

PIOTROWSKI, G. *et al.* Mechanical Studies of the Bone Bioglass Interfacial Bond. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 9, n. 4, p. 47–61, 1975.

PONSONNET, L. *et al.* Relationship between Surface Properties (Roughness, Wettability) of Titanium and Titanium Alloys and Cell Behaviour. **Materials Science and Engineering C**, v. 23, n. 4, p. 551–60, 2003.

RAMIRES, P.A. *et al.* Biological Behavior of Sol-Gel Coated Dental Implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n 6, p. 539–45, 2003.

REFFITT, D.M. *et al.* Orthosilicic Acid Stimulates Collagen Type 1 Synthesis and Osteoblastic Differentiation in Human Osteoblast-like Cells in Vitro. **Bone**, v. 32, n. 2, p. 127–35, 2003.

SURMENEV, R.A.; SURMENEVA, M.A.; IVANOVA, A.A. Significance of Calcium Phosphate Coatings for the Enhancement of New Bone Osteogenesis - A Review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 557–79, 2014.

TANG, Q.; BROOKS R.; RUSHTON N.; BEST S. Production and characterization of HA and SiHA coatings. **J Mater Sci Mater Med.**,v. 21, n. 1, p.173–81, 2010.

TERHEYDEN, H. *et al.* Osseointegration - Communication of Cells. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 10, p.1127–35, 2012.

VALERIO, P. *et al.* Effects of Extracellular Calcium Concentration on the Glutamate Release by Bioactive Glass (BG60S) Preincubated Osteoblasts. **Biomedical Materials**, v. 4, n. 4, 2009.

VALLIANT, E.M. *et al.* Role of PH and Temperature on Silica Network Formation and Calcium Incorporation into Sol-Gel Derived Bioactive Glasses. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 1613–19, 2012.

WENNERBERG, A., AND ALBREKTSSON, T. Effects of Titanium Surface Topography on Bone Integration: A Systematic Review. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, (SUPPL. 4), p.172–84, 2009.

WILSON, J. *et al.* Toxicology and Biocompatibility of Bioglasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 15, n. 6, p. 805–17, 1981.

XUEREB, M.; CAMILLERI, J.; ATTARD, N. Systematic Review of Current Dental Implant Coating Materials and Novel Coating Techniques. **The International Journal of Prosthodontics**, v. 28, n. 1, p. 51–59, 2015.

XYNOS, I.D. *et al.* Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-like Growth Factor II MRNA Expression and Protein Synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 2, p. 461–65, 2000a.

XYNOS, I.D. *et al.* Bioglass @45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation in Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering. **Calcified Tissue International**, v. 67, n. 4, p 321–29, 2000b.

XYNOS, I.D. *et al.* Gene-Expression Profiling of Human Osteoblasts Following Treatment with the Ionic Products of Bioglass® 45S5 Dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, n. 2, p. 151–57, 2001

YAMAMURO, T. Bioceramics. **Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics, Second Edition**, v. 28, p. 21–33, 2016.

YAZDANI, J. *et al.* A Short View on Nanohydroxyapatite as Coating of Dental Implants. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, p. 553–57, June, 2018.

YOSHII, S. *et al.* Strength of Bonding between A-W Glass-ceramic and the Surface of Bone Cortex. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 22, n.14 S, p. 327–38, 1988.

ZUIM, F.A. **Fabricação de lamela no microscópio de íons focalizados**: artefatos e medidas de espessura. 2017, 76 f. Dissertação (Mestrado) - Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, 2017.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA (2016-2019)

ARTIGOS PUBLICADOS

1 - Monteiro DDH, Limborço H, Guimarães RP, Moreira NA, Rodrigues WN, de Magalhães CS. Metallization and Ar-O plasma effects on dental enamel roughness evaluated with SEM and MeXTM for 3D reconstruction. *Microscopy Research & Technique*. 2020; 1-7

2 – Guimarães RP, Xavier LGO, Maltos KLM, Sá AF, Domingues RZ, Carvalho VE, Elias DC, Discacciati JAC, Pacheco CMF, Moreira AN. KOH group influence on titanium surfaces and pure sol-gel silica for enhanced osteogenic activity. *Journal of Biomaterials Applications*. 2020; 1-17 DOI: 10.1177/0885328220934323

ARTIGO SUBMETIDO

Rehabilitation of atrophic maxilla with prosthesis supported by implants fixed exclusively in sinus elevation areas

Rodrigo Porto Guimarães, DDS, MSc^a, Débora Drummond Hauss Monteiro, DDS, MSc^b, Claudia Silami de Magalhães, MSc, PhD^c, Allyson Nogueira Moreira, MSc, PhD^d

^a PhD Student, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

^b PhD Student, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

^c Professor, Department of Restorative Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^d Professor, Department of Restorative Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS CIENTÍFICOS EM FORMATO DE PÔSTER

Yamauti, M; Ferraz, CA; Ayala, AP; Lourenco, ERA; Santiago, SI; Cebalos, IG; **Guimarães, RP**. Caracterização da interface adesiva entre dentina e polímero carregado com vidro bioativo. In: "IX CONGRESSO DE MICROSCOPIA DOS MATERIAIS", 2016.

Guimarães RP; Girundi, FM; Lobato, AS. Uso dos laminados cerâmicos de espessura mínima para eliminação de diastemas anteriores. Relato de Caso. In: "CIOMIG", 2017.

Guimarães RP; Oliveira PAD; Oliveira AMSD. Efeitos da indução da diabetes e da administração da aminoguanidina na retenção biomecânica de implantes: um estudo em ratos. "XII ENCONTRO CIENTÍFICO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA-UFMG", 2016.

ORIENTAÇÃO DE MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO

Lagislayne Camargo de Bastos. Aspectos biológicos e mecânicos das conexões tipo cone morse. 2016. Monografia. (Especialização em Implantodontia) - Centro Universitário Ingá. Orientador: Rodrigo Porto Guimarães.

Marcela Reis Tomich. Tratamento de superfície de implantes em titânio. 2016. Monografia. (Especialização em Implantodontia) - Centro Universitário Ingá. Orientador: Rodrigo Porto Guimarães.

Mariana Mascarenhas de Souza Vieira. Utilização das BMP's na reconstruções teciduais em implantodontia. 2016. Monografia. (Especialização em Implantodontia) - Centro Universitário Ingá. Orientador: Rodrigo Porto Guimarães.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO

Monografias de curso de especialização

GIRUNDI, F. M.; Silva, GCC; **Guimarães RP**. Participação em banca de Caroline Cosme Silva. Avaliação clínica dos implantes curtos em mandíbula e maxila: fatores que otimizam a técnica. 2016. Monografia (Especialização em Implantodontia) - Centro Universitário Ingá.

GIRUNDI, F. M.; Silva, GCC; **Guimarães RP**. Participação em banca de Marcelli Lima da Silveira Rocha. Estudo comparativo das técnicas cirúrgicas de levantamento de seio maxilar em implantodontia. 2016. Monografia (Especialização em Implantodontia) - Centro Universitário Ingá.

GIRUNDI, F. M.; Silva, GCC; **Guimarães RP**. Participação em banca de Rita de Kassia Brum de Oliveira. Tratamento da periimplantite. 2016. Monografia (Especialização em Implantodontia) - Centro Universitário Ingá.

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

Participação em banca de Bianca Rezende Gonçalves. IV encontro científico de odontologia. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - FEAD.

Participação em banca de Meirielle André da Silva. V encontro científico de odontologia - Durabilidade das lentes de contato. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - FEAD

Participação em banca de Claudio Otacílio J. M. C. Silva. V encontro científico de odontologia - Tratamento conservador para nevralgia do trigêmio. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - FEAD

Participação em banca de Andréia Clarice Vieira Leão. V encontro científico de odontologia - Parestesia do nervo alveolar inferior. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - FEAD

ATIVIDADE DE ENSINO

Professor de odontologia da FEAD – outubro de 2016 à fevereiro de 2019

Professor de odontologia da Faculdade Arnaldo – março a julho de 2019.

Coordenador do curso de especialização em implantodontia da faculdade Ingá. 2013 a 2019.

CURSOS

Curso de bioestatística para profissionais de saúde: consistente, prática e descomplicada. Carga horária 12h, 2016.

Extensão universitária em curso teórico de boas práticas em cultura de células. Carga horária:20h, 2016. UFMG, Brasil.

Curso de capacitação em toxina botulínica e preenchimento facial. 2014

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

Participação como ouvinte do “E.max II International Meeting”, 2018.

Participação como ouvinte do “CIOMIG”, 2017.

Participação como ouvinte do “IX CONGRESSO DE MICROSCOPIA DOS MATERIAIS”, 2016.

Participação como ouvinte do “XII ENCONTRO CIENTÍFICO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA-UFMG”, 2016.