

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Engenharia**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas**

Ana Paula dos Reis Weitzel

**DESENVOLVIMENTO DE REVESTIMENTOS ANÓDICOS DE TiO<sub>2</sub>  
FUNCIONALIZADOS COM FOSFATO DE CÁLCIO E RANELATO DE  
ESTRÔNCIO PARA APLICAÇÕES ODONTOLÓGICAS**

Belo Horizonte

2023

Ana Paula dos Reis Weitzel

**DESENVOLVIMENTO DE REVESTIMENTOS ANÓDICOS DE TiO<sub>2</sub>  
FUNCIONALIZADOS COM FOSFATO DE CÁLCIO E RANELATO DE  
ESTRÔNCIO PARA APLICAÇÕES ODONTOLÓGICAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes

Coorientador: Prof. Dr. Maximiliano Delany Martins

Belo Horizonte

2023

W436d

Weitzel, Ana Paula dos Reis.

Desenvolvimento de revestimentos anódicos de tio2 funcionalizados com fosfato de cálcio e ranelato de estrôncio para aplicações odontológicas [recurso eletrônico] / Ana Paula dos Reis Weitzel . – 2023.

1 recurso online (113 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Eduardo Henrique Martins Nunes.

Coorientador: Maximiliano Delany Martins.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Inclui bibliografia.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Anodização - Teses. 4. Estrôncio - Teses. 5. Fosfato de cálcio - Teses. 6. Implantes dentários osseointegrados - Teses. 7. Nanotubos - Teses. 8. Titânio = Teses. I. Nunes, Eduardo Henrique Martins. II. Martins, Maximiliano Delany. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.


CDU: 620(043)




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE ENGENHARIA**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia**  
**Metalúrgica, Materiais e de Minas**



A tese intitulada "**Desenvolvimento de Revestimentos Anódicos de Tio<sub>2</sub> Funcionalizados com Fosfato de Cálcio e Ranelato de Estrôncio para Aplicações Odontológicas**", área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais, apresentada pela candidata **Ana Paula dos Reis Weitzel**, para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, foi aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:


  
Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes  
Orientador (UFMG)

Documento assinado digitalmente

 **MAXIMILIANO DALANY MARTINS**  
Data: 23/11/2023 14:00:57-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>


Dr. Maximiliano Dalany Martins  
Coorientador (CDTN)

Documento assinado digitalmente

 **ADELINA PINHEIRO SANTOS**  
Data: 23/11/2023 15:30:25-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>


Dra. Adelina Pinheiro Santos  
(CDTN)

Documento assinado digitalmente

 **TATIANE CRISTINE SILVA DE ALMEIDA**  
Data: 24/11/2023 08:18:29-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Tatiane Cristine Silva de Almeida  
(CDTN)

Documento assinado digitalmente

 **JORGIMARA DE OLIVEIRA BRAGA**  
Data: 26/11/2023 19:11:21-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>


Dra. Jorgimara de Oliveira Braga  
(UFMG)

Documento assinado digitalmente

 **TALITA MARTINS**  
Data: 27/11/2023 07:44:39-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Talita Martins  
(UFMG)

Documento assinado digitalmente

 **DANIEL MAJUSTE**  
Data: 15/02/2024 11:46:04-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas/UFMG

Belo Horizonte, 22 de novembro de 2023

---

*“É preciso de uma aldeia inteira para se educar uma criança” – Provérbio africano*

Dedico esta tese àqueles que nunca soltaram a minha mão, em especial durante a gestação do Álvaro e o meu puerpério; épocas de escrita dos artigos e desta tese.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus pela sabedoria e resiliência que tem me dado frente às provas.

Ao meu filho Álvaro, que alegra todos os meus dias com seu sorriso e aquece o meu coração.

O maior amor da minha vida!

Aos meus pais, Judith e Emmanoel, que foram minha rede de apoio, em especial à minha amada mãe que sempre me apoiou na vida acadêmica e cuida do meu filho com tanto amor.

Ao meu esposo, José Otávio, por ser o meu amor, meu norte, incentivo e exemplo profissional.

Ao Eduardo, pela orientação, amizade e empatia nessa jornada. Possui ética e humildade raras, tantas vezes escassas no meio acadêmico. Orgulho em ser sua aluna no PPGEM.

Ao meu coorientador Maximiliano, que sempre deixou abertas as portas do CDTN e do LabNano para mim, sempre me inspirou coragem, ética e me deu oportunidades de crescimento profissional.

Ao Renato, que contribuiu com o meu trabalho, crescimento e acreditou em mim. Quando eu me abatia, me estimulava a ir além e mostrava o quanto eu era capaz de superar as adversidades. Nunca me esquecerei que a minha vitória é sua também.

À Patrícia, pelo laço de amizade que criamos com a convivência no laboratório, além da contribuição com o DRX neste trabalho. Foi muito bom te encontrar.

À Elisa, pela sua amizade e companheirismo desde a minha iniciação científica e pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

À Tatiane, pela contribuição com os testes biológicos e pelas conversas que inspiram dinamismo e vontade de fazer as coisas acontecerem.

Ao Gabriel, pelas análises de AFM, sugestões e seu bom-humor.

À Fernanda, pelos seus interessantes questionamentos.

À colega Denise pelas análises de difusividade térmica e divagações sobre a maternidade.

Aos colegas João e Caio pelo auxílio na produção de amostras e nos testes biológicos.

Ao corpo docente do PPGEM-UFMG pelo conhecimento transmitido.

Ao Programa de Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Ao CDTN por proporcionar toda estrutura e apoio técnico.

À CAPES pela bolsa disponibilizada para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O titânio e suas ligas são amplamente utilizados na produção de implantes odontológicos devido à sua estabilidade química, biológica e mecânica. Atualmente, a superfície de titânio predominante utilizada na implantodontia é a SLA (*Sandblasted, large grit, acid-etched implant surface*), obtida pelos métodos de jateamento e tratamento ácido. Entretanto, esta superfície apresenta desvantagens tanto em seu processo de produção quanto na possibilidade da formação de cápsula fibrosa ao redor dos dispositivos, o que pode ocasionar na perda do implante. A literatura atual revela que uma camada nanotubular (NT) de TiO<sub>2</sub> aplicada sobre o titânio metálico é uma alternativa promissora. Isso se deve à sua capacidade de proporcionar uma maior área de contato entre o osso e o implante, ocasionando a aceleração do processo de osseointegração e reduzindo o tempo de recuperação do paciente. Com isso, funcionalizações da camada NT com compostos de fosfato de cálcio (CaP) são comuns, devido a sua similaridade à composição mineral óssea. Contudo, ainda são raros na literatura estudos comparativos entre a superfície NT funcionalizada e a superfície SLA. Além do CaP, o uso do ranelato de estrôncio (RSr), um fármaco empregado no tratamento da osteoporose e conhecido por atuar principalmente na diminuição da absorção óssea, mostra-se interessante para a funcionalização. Este trabalho consiste em produzir e caracterizar superfícies SLA e NT com compostos CaP e RSr. No primeiro capítulo de resultados desse trabalho, abordou-se a investigação das propriedades morfológicas e químicas destas superfícies, tanto antes como após a deposição de CaP pelo método de conversão química. No segundo capítulo, foi realizado um estudo comparativo entre a superfície NT como produzida e, após modificações com CaP, RSr e uma combinação desses compostos (CaP+RSr). Em ambos os estudos foram avaliados a efetividade das deposições e seus efeitos biológicos *in vitro*. Até o momento, a literatura não relata nenhuma comparação entre superfícies NT depositadas com CaP, RSr e CaP+RSr. Os resultados apontaram que as deposições foram bem-sucedidas e que as superfícies funcionalizadas são promissoras candidatas para aplicações odontológicas, mostrando alta viabilidade celular, diferenciação e mineralização.

**Palavras-chave:** Titânio; TiO<sub>2</sub>; anodização; fosfato de cálcio; ranelato de estrôncio, osseointegração; nanotubos.

## ABSTRACT

Titanium and its alloys are widely used in the manufacture of dental implants due to their chemical, biological, and mechanical stability. Currently, the predominant titanium surface in implant dentistry is SLA, which is obtained by sandblasting and acid treatment. However, this surface has disadvantages both in the production process and in the possibility of fibrous capsule formation around the devices, which can lead to the loss of the implant. Recent literature reports that a nanotubular layer of TiO<sub>2</sub> (NT) formed on metallic titanium is a good alternative because it provides a larger bone-implant contact surface and accelerates the osseointegration process, resulting in a shorter patient recovery time. Thus, functionalization of the NT layer with calcium phosphate (CaP) compounds is common due to its similarity to bone mineral composition, but comparative studies between functionalized NT and the SLA surface are still rare in the literature. In addition to CaP, the use of strontium ranelate (SrR), a drug used in the treatment of osteoporosis that acts mainly by reducing bone resorption, as a functionalization is interesting. This work dealt with the fabrication, characterization, and functionalization of SLA and NT surfaces with CaP compounds and strontium ranelate, and the results were presented in two chapters. The first chapter deals with the study of the morphological and chemical properties of these surfaces before and after the deposition of CaP by the chemical conversion method. The second chapter includes a comparative study between the NT surface as produced and depositions with CaP, SrR, and a combination of these substances (CaP+SrR). Both studies evaluated the efficacy of the coatings and their biological effects in vitro. Furthermore, a comparison between deposited NT surfaces with CaP, SrR, and CaP + SrR has not been reported in the literature. The results indicated that the deposition was successful and that the functionalized surfaces are promising candidates for dental use, showing high cell viability, differentiation, and mineralization.

**Keywords:** Titanium; TiO<sub>2</sub>; anodizing; calcium phosphate; strontium ranelate, osseointegration; nanotubes.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Imagem MEV de células MC3T3-E1, cultivadas sobre superfície nanotubular de TiO <sub>2</sub> com nanotubos de aproximadamente 100 nm de diâmetro. (b) Desenho esquemático da fixação de osteoblastos sobre superfície de titânia nanotubular por intermédio de proteínas (Adaptado de Marchezini <i>et al.</i> (2022) e (Minagar <i>et al.</i> (2012)).....	22
Figura 2: Desenho esquemático das etapas de formação de nanotubos de TiO <sub>2</sub> sobre a superfície do titânio metálico: (a) diagramada cuba eletrolítica, (b) formação/dissolução da camada de TiO <sub>2</sub> (início e formação dos nanotubos). (Adaptado de Wang <i>et al.</i> , 2020).....	24
Figura 3: Imagem MEV de superfície nanotubular de TiO <sub>2</sub> obtida no LabNano, pelo método de anodização a 25 V, eletrólito contendo H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + HF.....	25
Figura 4: Densidade de células U2OS (osteosarcoma humano) cultivadas durante 44 h sobre: recobrimento CaP depositado em nanotubos de TiO <sub>2</sub> (20 V); nanotubos de TiO <sub>2</sub> e substrato de titânio puro como recebido; (PISAREK, 2012).....	27
Figura 5: Atividade de fosfatase alcalina de células osteoblásticas primárias após cultura em vários substratos até 21 dias. Ti (substrato de Ti puro, altamente polido e quimicamente tratado), com recobrimento Mn-CHA (manganês + hidroxiapatita carbonatada) e OCP (octa fosfato de cálcio); (BIGI <i>et al.</i> , 2005).....	27
Figura 6: Desenho esquemático sobre a resposta biológica em recobrimentos de nACP (nanofosfato de cálcio amorfo) em implantes de titânio. (a) implante recoberto com nACP, (b) liberação de Ca <sup>2+</sup> and (PO <sub>4</sub> ) <sup>3-</sup> provenientes da hidrólise de ACP, (c) ligação celular no implante com ajuda de receptores de proteínas e integrinas, (d) proliferação celular na superfície, (e) formação da apatita na superfície (Adaptado de WANG <i>et al.</i> , 2014).....	29
Figura 7: Desenho esquemático do sistema RANK/RANKL/OPG no processo de remodelação óssea, (Adaptado de Bezerra, (2016)).....	30
Figura 8: Molécula do ranelato de estrôncio (BORCIANI <i>et al.</i> , 2022).....	31
Figura 9: Ação dual do ranelato de estrôncio na matriz óssea (Adaptado de Querido <i>et al.</i> , 2016).....	31
Figura 10: Heterogeneidade da distribuição de Sr no osso. Imagem SEI de biópsia óssea de mulher após tratamento com ranelato de estrôncio, seguida de mapa EDS elementar. (Adaptado de Boivin <i>et al.</i> , (2009) e Querido; <i>et al.</i> , (2016)).....	32
Figura 11: Expressão relativa da fosfatase alcalina por células tronco mesenquimais cultivadas em diferentes substratos por duas semanas (ZHAO <i>et al.</i> , 2013).....	34

Figura 12: Perfis de tempo de liberação não cumulativa de estrôncio (a) e, conteúdo total de estrôncio (b) dos nanotubos funcionalizados com estrôncio (ZHAO <i>et al.</i> , 2013).....	34
Figura 13: Representação esquemática do trabalho experimental realizado neste estudo. (a) amostras de Ti; (b) superfície NT obtida por anodização; (c) Superfície SLA fornecida pelo fabricante; (d) etapa de imersão em NaOH; (e) imersão das amostras em solução SCS.....	59
Figura 14: (a) Comparação dos valores de microdureza para amostras NT e SLA. Imagens AFM mostrando a topografia da superfície de NT (b – c) e SLA (d – e).....	65
Figura 15: (a) Imagens mostrando a molhabilidade superficial de amostras submetidas a diferentes tratamentos: (i) SLA; (ii) imersão em NaOH; (iii) imersão em NaOH seguida de conversão química em SCS por 24 h; (iv) NT; (v) imersão em solução de NaOH; (vi) imersão em solução de NaOH e SCS por 24 h. (b) Ângulos de contato com a água avaliados para essas amostras. Inserção: Imagens AFM de superfícies SLA e NT após tratamento alcalino com solução de NaOH.....	67
Figura 16: Imagens SEM de substratos SLA e NT antes (a – b) e após (c – f) imersão em SCS. As micrografias (a), (c) e (e) correspondem à superfície SLA, enquanto (b), (d) e (f) referem-se à amostra do NT.....	69
Figura 17: (a) Mapeamento elementar de EDS e (b) espectro representativo de EDS da superfície NT imersa em solução SCS a 37 °C por 24 h.....	70
Figura 18: Padrões GIXRD de amostras NT e SLA imersas em solução SCS por 12 ou 24 horas.....	70
Figura 19: Levantamento de espectros XP de superfícies NT e SLA imersas em SCS por 24 h.....	71
Figura 20: Espectros FTIR de superfícies NT e SLA após 24 h de imersão em solução SCS.....	73
Figura 21: Evolução esquemática observada para superfícies de Ti testadas neste trabalho em função do tratamento aplicado.....	75
Figura 22: (a) Ensaio MTT mostrando a viabilidade de células MC3T3-E1 após 24, 48 ou 72 horas. (b) Mineralização da matriz extracelular após 10, 14 e 21 dias de cultura. (c) Atividade da fosfatase alcalina (ALP) medida após 3, 7 ou 14 dias. *p < 0,05 vs. grupo controle; #p < 0,05 vs. SLA; αp < 0,05 vs. NT.....	76
Figura 23: Esquema do trabalho experimental realizado neste estudo. (a) amostras de Ti; (b) oxidação anódica; (b1) superfície de nanotubos de TiO <sub>2</sub> ; (c) imersão em solução de NaOH; (d-e) etapa de imersão; f) amostras modificadas à superfície.....	86

Figura 24: (a) Imagens AFM de superfícies NT mostrando diferentes aspectos da topografia da superfície. (b) Imagens de MEV obtidas para amostras preparadas neste estudo. (i-ii) amostra de Ti nanotubular; (iii-iv) amostra modificada com CaP; (v-vi) amostra modificada com CaP e RSr; (vii-viii) amostra modificada com RSr. O círculo amarelo indica a presença de estruturas semelhantes a agulhas nas amostras modificadas, típicas de compostos de CaP.....	91
Figura 25: mapeamento EDS obtido para a amostra NT (a) antes e após a imersão em (b) soluções de CaP, (c) CaP + RSr e (d) RSr.....	92
Figura 26: espectros de EDS coletados para a superfície do NT (a) antes e após a imersão em (b) soluções de RSr, (c) CaP e (d) CaP + RSr.....	93
Figura 27: (a) levantamento dos espectros XP e (b) padrões GIXRD da superfície NT antes (i) e, após a imersão em soluções RSr (ii), CaP (iii) e RSr + CaP (iv).....	95
Figura 28: medidas do ângulo de contato da superfície NT antes e após a imersão nas soluções CaP, CaP + RSr e RSr.....	96
Figura 29: (a) ensaio de MTT mostrando a viabilidade das células MC3T3-E1 após 24 ou 48 h. (b) atividade da fosfatase alcalina (FA) medida após 3, 7 ou 14 dias. (c) mineralização da matriz extracelular após 10, 14 e 21 dias de cultivo. *p < 0,05 vs. grupo controle; #p < 0,05 vs. NT/CaP; @p < 0,05 vs. NT; &p < 0,05 vs. NT / CaP + RSr.....	98

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Opções de soluções inorgânicas contendo fluoreto para a formação de estruturas nanotubulares (Adaptado de YAO; WEBSTER, 2006).....	24
Tabela 2 - Opções de soluções orgânicas para obtenção de estruturas nanotubulares e suas respectivas temperaturas e viscosidade (Adaptado de MACAK; SCHMUKI, 2006).....	25
Tabela 3 - Nome químico, nome mineral e composição de várias cerâmicas de base CaP (Adaptado de LAWSON; CZERNUSZKA, 1998).....	26
Tabela 4: Revisão da literatura com tendências e funcionalização.....	37
Tabela 5: Composição elementar da superfície obtida por XPS (em %).....	72
Tabela 6: - Energia de ligação dos picos XPS (em eV).....	73
Tabela 7: Composição das soluções de CaP e RSr preparadas neste estudo.....	86
Tabela 8: Composição química elementar determinada pelo XPS (at.%).....	94
Tabela 9: Difusividade térmica medida a 25 °C.....	99
Tabela 10: Trabalhos recentes sobre modificação de superfícies nanotubulares de Ti.....	100

## SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM - Microscopia de força atômica

BCIP - 5-bromo- 4-cloro-3-indolilfosfato

BMP - Proteína óssea morfogenética

CaP - Fosfato de cálcio

CaSR – Receptor de cálcio

DRX - Difração de raios X

ECM - Matriz extracelular

EDS - Espectroscopia de raios X por dispersão em energia

FA - Fosfatase alcalina

FBS - Soro fetal bovino

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

HA - Hidroxiapatita

hBMP - Proteína óssea morfogenética humana

HCA - Hidroxiapatita carbonatada

MAO - Oxidação anódica por micro-arco

MC3T3-E1 - Preosteoblastos imortalizados extraídos de calvárias de murinos

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

nACP - Nano fosfato de cálcio amorfo

NBT - Nitroazul tetrazólio

NT- Nanotubos

OCP - Octafosfato de cálcio

OPG - Osteoprotegerina

PBS - Tampão fosfato-salino

RANK - Receptor ativador do fator nuclear Kappa- $\beta$  ligante

RANKL - Ativador do receptor do fator nuclear-ligante Kappa- $\beta$

RhoA - Proteína relacionada à regulação do citoesqueleto

RSr - Ranelato de estrôncio

SCS - Solução supersaturada de cálcio

SEI – Microscopia de elétrons secundários

SLA - Jateamento, grãos grandes, ataque ácido

TiO<sub>2</sub> – Óxido de titânio

XPS – Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	16
2.	OBJETIVOS .....	19
2.1	OBJETIVO GERAL .....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
3.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
3.1	RESPOSTAS BIOLÓGICAS ÀS SUPERFÍCIES MICRO E NANO- ESTRUTURADAS DE TiO <sub>2</sub> .....	20
3.2	OBTENÇÃO DA SUPERFÍCIE NANOESTRUTURADA DE TiO <sub>2</sub> .....	22
3.3	FUNCIONALIZAÇÕES DA SUPERFÍCIE NANOTUBULAR .....	26
3.3.1	RECOBRIMENTO COM COMPOSTOS CaP .....	26
3.3.2	EFEITOS DO RANELATO DE ESTRÔNCIO .....	29
3.4	TENDÊNCIAS NA FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE TiO <sub>2</sub> .	35
3.5	REFERÊNCIAS.....	49
4.	ESTUDO COMPARATIVO DA DEPOSIÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO EM SUBSTRATOS DE TITÂNIO NANOTUBULARES E JATEADOS COM GRÃOS GRANDES E ATAQUE ÁCIDO.....	56
4.1	INTRODUÇÃO .....	56
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.2.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	58
4.2.1.1	SUPERFÍCIES SLA.....	58
4.2.1.2	SUPERFÍCIES NT .....	58
4.2.1.3	REVESTIMENTOS CaP.....	59
4.3	CARACTERIZAÇÕES .....	60
4.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	61
4.4.1	CULTURA CELULAR.....	61
4.4.2	VIABILIDADE CELULAR .....	61
4.4.3	DIFERENCIAÇÃO CELULAR .....	62
4.4.4	ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA .....	62
4.4.5	ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO.....	63
4.4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	63
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
4.6	CONCLUSÕES .....	77
4.7	REFERÊNCIAS .....	79

<b>5. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE SUPERFÍCIES NANOTUBULARES DE Ti COM FOSFATO DE CÁLCIO E RANELATO DE ESTRÔNCIO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS .....</b>	<b>83</b>
<b>5.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>5.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
<b>5.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>85</b>
<b>5.2.1.1 SUBSTRATOS NT .....</b>	<b>85</b>
<b>5.2.1.2 MODIFICAÇÃO COM CaP e RSr.....</b>	<b>85</b>
<b>5.3 CARACTERIZAÇÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>5.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>88</b>
<b>5.4.1 CULTURA CELULAR .....</b>	<b>88</b>
<b>5.4.2 VIABILIDADE CELULAR.....</b>	<b>88</b>
<b>5.4.3 DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....</b>	<b>89</b>
<b>5.4.4 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA.....</b>	<b>89</b>
<b>5.4.5 ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>5.4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>90</b>
<b>5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>5.6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>5.7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>104</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>110</b>
<b>6.1 CONCLUSÕES .....</b>	<b>110</b>
<b>6.2 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>113</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Biomateriais são materiais empregados na substituição ou no reparo de tecidos vivos ou danificados. Os primeiros registros do seu uso, particularmente na odontologia, remontam há cerca de 2000 anos atrás, quando o ouro era utilizado para a substituição de dentes (LANGER, 2004). Além dos metais, outros materiais ganharam destaque ao longo do tempo, incluindo polímeros e cerâmicas. No grupo dos materiais metálicos, destacam-se as ligas Co-Cr-Mo e Co-Ni-Cr-Mo, os aços inoxidáveis com ênfase no 316L, o titânio puro e a liga Ti-6Al-4V. Para prevenir falhas em implantes, é fundamental que seus componentes exibam propriedades como resistência à corrosão, resistência à fadiga, resistência ao desgaste e tenacidade à fratura. Implantes odontológicos, em particular, são submetidos a cargas cíclicas de elevada intensidade devido aos movimentos da mastigação. Além disso, fluidos biológicos presentes ao redor desses dispositivos geralmente contêm íons potencialmente corrosivos, como por exemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  entre outros; o que pode agravar o processo de corrosão. Esse contexto pode resultar na deterioração do implante e, como consequência, na liberação de partículas tóxicas tanto para o tecido adjacente como para outros tecidos e órgãos. Essas partículas, devido ao seu tamanho reduzido, podem ser transportadas pela corrente sanguínea. Portanto, é fundamental que os biomateriais exibam, acima de tudo, uma notável resistência à corrosão (ORÉFICE, R; PEREIRA, M.; & MANSUR, H.; 2012).

O titânio (Ti) foi consolidado como um biomaterial ao final da década 1960, quando Brånemark, *et al.* (1969) observaram a excelente interação desse metal com o tecido das tíbias de coelho, sem que houvesse rejeição. A partir dessa descoberta, surgiram estudos adicionais que posteriormente esclareceram o fenômeno conhecido como osseointegração. Devido ao fato de atender aos requisitos necessários para um biomaterial, o titânio é amplamente empregado em implantes permanentes, com o titânio comercialmente puro (Ti c.p.) predominando na área odontológica e as ligas Ti-6Al-4V sendo mais comuns em aplicações ortopédicas (ELIAS *et al.*, 2008; WILLIAMS, 2008). É sabido que quando se utiliza biomateriais inertes, como o Ti, não ocorre uma formação efetiva de ligações interfaciais entre o osso e o implante. Essa situação pode levar à movimentação do implante e à formação de uma cápsula fibrosa que não adere ao dispositivo, resultando na deterioração do dispositivo ou do tecido circundante. No entanto, o tecido fibroso formado pode ser suficientemente fino para possibilitar o sucesso clínico do implante se o processo de implantação for realizado com um bom ajuste mecânico, promovendo, assim, uma fixação morfológica. Isso ocorre quando o

crescimento do tecido ocorre nas irregularidades superficiais por meio da cementação do componente ou do ajuste por aplicação de pressão (ORÉFICE, R; PEREIRA, M.; & MANSUR, H.; 2012).

Atualmente, a superfície micro-rugosa SLA<sup>®</sup> (*sandblasting, large grit, acid etching*), patenteada pela empresa Straumann, é a mais comumente utilizada em pinos odontológicos, sendo considerada o padrão comercial para implantes odontológicos. É também uma das superfícies mais documentadas da odontologia e apresenta boa resposta osteocondutiva. No entanto, o risco de falhas ainda persiste, uma vez que esse biomaterial proporciona uma fixação do tipo morfológica e pode estar sujeito à formação de uma cápsula fibrosa espessa. Dessa maneira, a busca por uma superfície que supere o desempenho oferecido pela superfície SLA ainda é um objetivo relevante. Considerando que a resposta de um biomaterial ao ambiente biológico está intimamente relacionada às suas propriedades de superfície, é fundamental empreender esforços na busca por modificações estratégicas. Essas modificações podem incluir alterações morfológicas, químicas ou mesmo uma combinação de ambas, com o propósito de alcançar uma superfície biologicamente ativa, capaz de aprimorar a interação entre o implante e os tecidos circundantes.

Neste estudo, foi investigada uma alternativa à superfície SLA por meio de modificações morfológicas e químicas da superfície do Ti c.p. com o objetivo de aprimorar o processo de osseointegração. A modificação morfológica envolveu o processo eletroquímico de anodização. A partir de uma diferença de potencial aplicada entre o Ti (anodo) e um eletrodo inerte (catodo) imersos em solução ácida contendo ânions fluoreto (F<sup>-</sup>), é possível a formação/dissolução simultâneas de uma camada óxida de TiO<sub>2</sub>, gerando assim uma superfície de conformação nanotubular (NT). Embora essa camada seja biologicamente inerte, ela aumenta a área de contato entre o osso e o implante, favorecendo o processo de osseointegração.

As modificações químicas, por sua vez, consistiram na deposição de compostos de fosfato de cálcio (CaP) e ranelato de estrôncio (RSr) sobre a camada NT obtida. Os compostos CaP são quimicamente semelhantes à fase mineral óssea e segundo a literatura, influenciam positivamente os processos de proliferação, diferenciação e mineralização celular (ELIAZ; METOKI, 2017; JAIN, 2022; KATIĆ *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2022). Por sua vez, o RSr consiste em uma droga atuante no processo de remodelação óssea, capaz de aumentar a

proliferação de osteoblastos e reduzir a taxa de absorção óssea (HABERMANN *et al.*, 2010; QUERIDO *et al.*, 2016).

Essas modificações são discutidas nesta tese no formato de dois artigos científicos, apresentados nos capítulos 4 e 5. No primeiro trabalho, a superfície SLA foi usada como ponto de referência para comparações com a NT antes e após a imersão em CaP, uma abordagem raramente encontrada na literatura. No segundo trabalho, a superfície NT foi utilizada como referência para avaliar sua funcionalização com CaP, RSr e CaP+RSr. Os materiais preparados foram caracterizados em relação à sua morfologia, propriedades físico-químicas e comportamento biológico. Vale ressaltar que a preparação da superfície nanotubular de TiO<sub>2</sub> pelo método de anodização já foi abordada anteriormente na dissertação de mestrado defendida por Elisa Marchezini (2015) intitulada “Estudo da modificação de superfície por oxidação anódica aplicada a titânio para implantes osseointegráveis” e em seu artigo de 2020. Em outra dissertação de mestrado, intitulada “Funcionalização da camada nanoporosa de TiO<sub>2</sub> obtida por anodização via deposição de compostos de fosfato de cálcio”, Ana Paula Weitzel (2017) avaliou as metodologias de imersão e eletrodeposição desta superfície em compostos de CaP. No entanto, a padronização da metodologia de imersão, os testes realizados e as comparações apresentadas neste trabalho são inovações nesse método. Ambas as dissertações se referem a trabalhos desenvolvidos no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem como intuito avaliar as deposições de compostos CaP e RSr sobre a superfície nanotubular de TiO<sub>2</sub> via conversão química dos compostos CaP e imersão em RSr, frente às suas características físico-químicas, efetividade das funcionalizações e seu efeito biológico, vislumbrando a futura utilização desses biomateriais como implantes osseointegráveis.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Preparar os revestimentos de TiO<sub>2</sub> nanotubular através da técnica de oxidação anódica.
- Modificar as superfícies obtidas via conversão química de compostos CaP e imersão em RSr.
- Caracterizar as superfícies e os recobrimentos preparados de acordo com suas propriedades físico-químicas.
- Realizar testes biológicos *in vitro* com o objetivo de comparar o desempenho das camadas funcionalizadas em relação à superfície comercial SLA, bem como em relação à superfície NT preparada, serve como referência.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 RESPOSTAS BIOLÓGICAS ÀS SUPERFÍCIES MICRO E NANO-ESTRUTURADAS DE TiO<sub>2</sub>

Um implante biocompatível deve apresentar uma integração ótima com o tecido vivo, sem causar nenhum efeito nocivo, como a formação de tecido fibrótico ou sua encapsulação. Além disso, deve evitar a ocorrência de eventos como morte de células ou tecidos, formação de tumores, danos genéticos, respostas imunológicas negativas e coagulação sanguínea. Portanto, o design e acabamento superficiais dos implantes são aspectos importantes que determinam o sucesso final da implantação, principalmente em aplicações clínicas (SANTOS-COQUILLAT et al., 2021).

É bem estabelecido que superfícies rugosas são benéficas para o processo de osseointegração. De acordo com Boyan *et al.* (2002) e Lossdörfer *et al.* (2004), a micro-rugosidade tem a capacidade de estimular fatores reguladores que promovem a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (células responsáveis pela síntese da matriz óssea) e, ao mesmo tempo, reduzir a atividade dos osteoclastos (células responsáveis pela absorção óssea). Um exemplo do bom desempenho destas superfícies é a SLA (*sandblasting, large grit, acid etching*), considerada o padrão ideal em implantes odontológicos. O tratamento SLA consiste no jateamento do titânio puro com partículas de alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) com tamanho entre 250 e 500 µm, seguido de ataque com solução contendo os ácidos clorídrico (HCl) e sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Esse processo produz microrugosidades na faixa de 2 a 4 µm (STRAUMANN, 2014). A produção desta superfície é atualmente bastante popularizada entre as fabricantes de implantes. No entanto, alguns estudos relatam que sua microestrutura pode prejudicar o processo de proliferação celular, resultando em uma menor formação de tecido ósseo ao redor do implante (OH et al., 2009; SCHWARTZ et al., 2009). Além disso, Klein *et al.* (2010) reportam que superfícies SLA podem exibir baixa hidrofiliabilidade, além de grande propensão à contaminação.

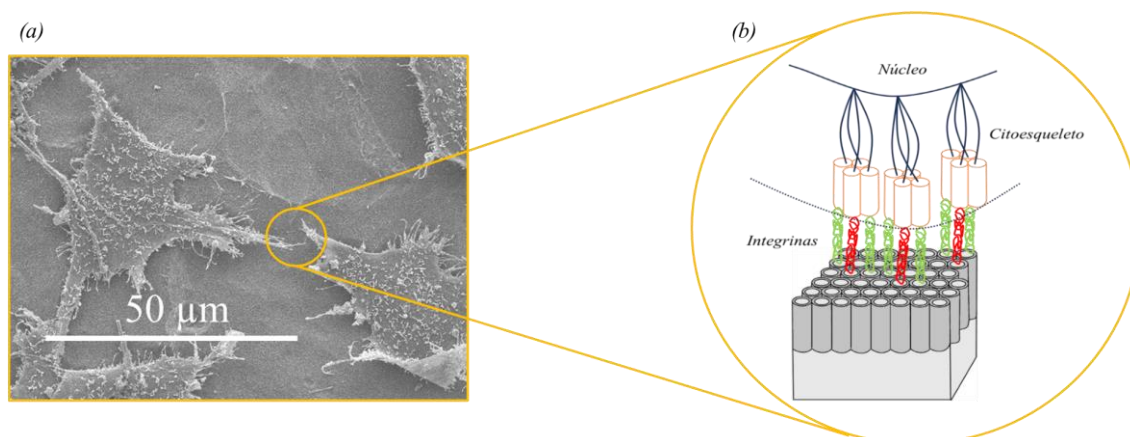
Nesse contexto, estudos focados na produção de superfícies com estruturas em escala nanométrica têm recebido atenção significativa (MARCHEZINI et al., 2020), especialmente em relação às respostas celulares de estruturas nanotubulares de TiO<sub>2</sub> (AGUIRRE OCAMPO et al., 2022; KAZEMI, 2023; KOBAYASHI et al., 2022; MARCHEZINI et al., 2020; NEGRESCU et al., 2022), crescidas sobre a superfície do Ti metálico. A camada óxida de Ti

é altamente resistente à corrosão, superando até mesmo o aço inoxidável nesse quesito (ORÉFICE, PEREIRA, & MANSUR, 2012). A estrutura nanotubular do  $\text{TiO}_2$  confere maior área superficial, aumentando a interação entre as células e o implante. É reportado que quanto melhor for essa interação, maior é a possibilidade de fixação celular na superfície do dispositivo.

De acordo com Ocampo *et al.* (2022), Mendonça *et al.* (2009) e Webster; Ejiófor (2004), a rugosidade e topografia em nanoescala favorecem principalmente o processo de adesão dos osteoblastos. Tal fato pode melhorar as taxas de proliferação e diferenciação celular, uma vez que a adesão é um pré-requisito para que esses processos ocorram e possibilitem o crescimento de um novo tecido. Durante este processo, proteínas adesivas, tais como a fibronectina e a vitronectina, são reconhecidas por receptores celulares denominados integrinas. As integrinas ligam-se diretamente aos microfilamentos intracelulares, que são formados por proteínas de actina e miosina. Os microfilamentos são parte do citoesqueleto e são responsáveis pela adesão celular. Além disso, as integrinas também se ligam a enzimas sinalizadoras (RhoA), capazes de transmitir informações que controlem todas as outras principais atividades celulares, como por exemplo, mudanças na morfologia celular, proliferação, migração, diferenciação, expressão gênica e apoptose de maneira sinérgica com hormônios e fatores de crescimento. Portanto, a adesão à matriz extracelular e às superfícies extracelulares provoca uma aglomeração de integrinas, formando complexos de adesão focal e ativando as cascatas de sinalização intracelular no núcleo e no citoesqueleto (RIVERA-CHACON *et al.*, 2013).

Além de maior área superficial, a topografia em escala nanométrica apresenta maior compatibilidade dimensional com elementos menores das células. Oh *et al.*, (2006), reportaram que a adesão e proliferação celular foram melhoradas sobre um substrato de  $\text{TiO}_2$  nanoestruturado devido a um melhor ancoramento dos filopódios (ramificações) das células osteoblásticas, crescendo dentro dos nanotubos, formando assim uma estrutura celular intertravada. Ademais, estudos como o de Minagar *et al.* (2012), relatam que as proteínas de ligação, como as integrinas, também têm escala nanométrica, potencializando ainda mais o contato com os nanotubos, conforme demonstrado no desenho esquemático da Figura 1. Vale mencionar também que o caráter hidrofílico do  $\text{TiO}_2$  nanotubular é outro fator que facilita a adsorção de proteínas, presentes no meio biológico (DAS; *et al.*; 2009). Outra vantagem dessa configuração é a grande possibilidade de funcionalização via deposição e/ou internalização de diversos compostos, orgânicos ou inorgânicos, com potenciais benefícios à osseointegração.

**Figura 1:** (a) Imagem MEV de células MC3T3-E1, cultivadas sobre superfície nanotubular de TiO<sub>2</sub> com nanotubos de aproximadamente 100 nm de diâmetro. (b) Desenho esquemático da fixação de osteoblastos sobre superfície de titânia nanotubular por intermédio de proteínas.



Fonte: Adaptado de Marchezini *et al.* (2022) e (Minagar *et al.* (2012).

### 3.2 OBTENÇÃO DA SUPERFÍCIE NANOESTRUTURADA DE TiO<sub>2</sub>

A técnica de oxidação anódica é utilizada para a obtenção de camadas nanotubulares de TiO<sub>2</sub> sobre a superfície do titânio metálico. Esse método eletroquímico promove a modificação de superfícies a partir da formação, crescimento e dissolução simultâneas de uma camada passiva. Para isso, é utilizada uma célula eletroquímica, composta por uma fonte de tensão, uma solução eletrolítica e dois eletrodos, onde ocorrem reações de redução-oxidação. O titânio é utilizado como anodo (conectado ao eletrodo positivo), e um material inoxidável é utilizado como catodo (associado ao eletrodo negativo). Como as reações envolvidas não são espontâneas, uma diferença de potencial constante é aplicada durante todo o processo, gerando a condução de corrente elétrica no circuito.

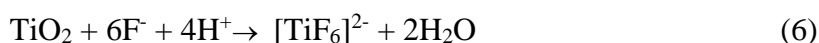
Com a passagem da corrente elétrica pelo eletrólito, ocorre a eletrólise da água, como demonstrado na Equação (1). Simultaneamente, ocorre a ionização do HF, como mostrado na Equação (2).



Neste momento, também ocorre a oxidação do Ti para  $Ti^{4+}$  e, paralelamente, a difusão do  $O^{2-}$  proveniente da água para o Ti oxidado. A partir disso, ocorre a formação da camada óxida compacta, como descrito nas Equações (3) a (5), criando assim as interfaces Ti-TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>-eletrólito.



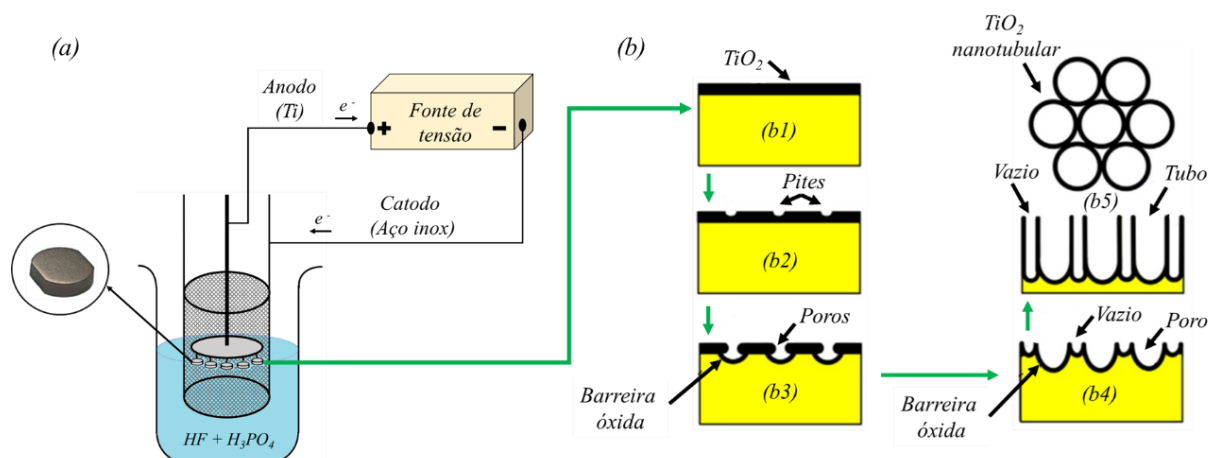
Durante a formação do TiO<sub>2</sub>, também ocorre o enfraquecimento das ligações Ti-O devido à polarização. Além disso, o aumento da resistência elétrica do material provoca um aquecimento local, que promove a dissolução da barreira oxidada em regiões preferenciais pelos ânions fluoreto. Isso inicia a formação de tubos de dimensões nanométricos e complexos solúveis em água (BAUER *et al.*, 2006; MARCHEZINI *et al.*, 2020; ROY *et al.*, 2011). Quando as taxas de formação e dissolução do óxido se igualam ocorre o crescimento constante dos nanotubos durante o processo. A Equação (6) demonstra a reação de dissolução do óxido.



A Figura 2 apresenta um desenho esquemático da composição da cuba eletrolítica seguido das fases de formação da titânia nanotubular. Na fase (a), ocorrem as reações de oxidação e redução durante a passagem de corrente elétrica. Na fase (b), é explicado o desenvolvimento dos nanotubos de TiO<sub>2</sub>. A partir da formação da película óxida de titânia compacta (b1), sua dissolução pontual leva à formação de pites (b2) e poros (b3). Em (b4), a dissolução dos poros primitivos continua acontecendo mais profundamente, enquanto as regiões ainda não dissolvidas começam a sofrer a ação do fluoreto, criando o espaçamento entre os poros. A dissolução e o crescimento contínuos na região dos poros e espaços vazios ocorrem a partir da barreira óxida mais profunda. Finalmente, obtém-se uma camada com razoável grau de ordenação, formada por fendas cilíndricas muito próximas, separadas do Ti do substrato pela barreira de óxido.



**Figura 2:** Desenho esquemático das etapas de formação de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  sobre a superfície do titânio metálico: (a) diagrama da cuba eletrolítica, (b) formação/dissolução da camada de  $\text{TiO}_2$  (início e formação dos nanotubos).



Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (2020).

Em relação ao eletrólito, existem diversos meios de natureza orgânica e inorgânica. Entretanto, um componente quase primordial para a formação dos nanotubos é o flúor, devido à atuação do seu ânion ( $\text{F}^-$ ) na dissolução da camada, como mostrado nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Opções de soluções inorgânicas contendo fluoreto para a formação de estruturas nanotubulares.

Eletrólito	Tensão (V)	Tempo (h)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Espessura (nm)	Diâmetro do tubo (nm)
$\text{CH}_3\text{COOH}$ e 0.5 M HF	10	4	-	60	500 (int.)
0.5 ou 1.5 % HF	10-40	<1	18	250	25-65
0.5 % HF	10-23	<1	-	300	22-76
KF e NaF (4.5)	25	20	-	4400	115
DMSO e $\text{CH}_3\text{COOH}$ e 4 % HF	20	70	TA	2300	60
1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ e 0.15 % HF	30	24	-	540	140
$\text{CH}_3\text{COOH}$ e 0.5 % $\text{NH}_4\text{F}$	20	1	-	200	30
1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0.5 % $\text{NH}_4\text{F}$	20	-	-	2500	100
1 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ e 1M $\text{H}_3\text{PO}_4$ e 0.5 % HF	20	40	-	4070	50
0.138 M HF ou NaF + 0.5 M $\text{H}_3\text{PO}_4$	20	-	24	500	100-200 (ext.)

TA = temperatura ambiente

Fonte: Adaptado de YAO; WEBSTER (2006)

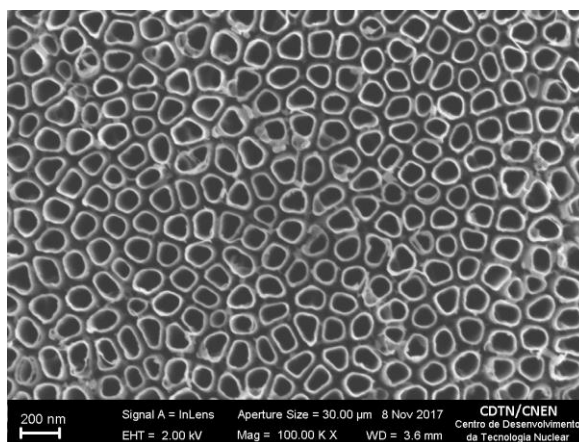
**Tabela 2** - Opções de soluções orgânicas para obtenção de estruturas nanotubulares e suas respectivas temperaturas e viscosidade.

Eletrólito	Temperatura (°C)	Viscosidade dinâmica (Pa.s)
Glycerol + 0.5 wt.% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	~1.5
Glycerol + 0.5 wt.% NH <sub>4</sub> F	0	~12
Glycerol + 0.5 wt.% NH <sub>4</sub> F	20	~1.5
Glycerol + 0.5 wt.% NH <sub>4</sub> F	40	~0.3
Ethylene Glycol + 0.5 wt.% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	~0.022
Ethylene Glycol + 0.5 wt.% NH <sub>4</sub> F	20	~0.022
Glycerol + H <sub>2</sub> O + 0.5 wt.% NH <sub>4</sub> F	20	~0.004
1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 0.5 wt.% NH <sub>4</sub> F	20	~0.001

Fonte: Adaptado de MACAK; SCHMUKI (2006).

Marchezini *et al.* (2020) demonstraram a possibilidade de padronizar os parâmetros do processo de anodização utilizando a solução de HF + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, o que resultou na obtenção de nanotubos com diâmetros controlados variando entre 15 e 100 nm, por meio da alteração da tensão aplicada entre 1 e 30 V. A Figura 3 apresenta imagem de revestimento de TiO<sub>2</sub> produzido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Nanoscopia do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (LabNano/CDTN).

**Figura 3:** Imagem MEV de superfície nanotubular de TiO<sub>2</sub> obtida pelo método de anodização a 25 V, eletrólito contendo H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + HF.



Fonte: Imagem de amostra produzida neste trabalho.

### 3.3 FUNCIONALIZAÇÕES DA SUPERFÍCIE NANOTUBULAR

#### 3.3.1 RECOBRIMENTO COM COMPOSTOS CaP

Devido à grande possibilidade de funcionalização da camada nanoestruturada, é comum a deposição e/ou incorporação de diversos compostos, com o objetivo de avaliar suas potencialidades quanto ao processo de osseointegração. Estes agentes vão desde bactericidas a indutores de respostas celulares específicas. Compostos de fosfatos de cálcio são comumente estudados (ELIAZ; METOKI, 2017; JAIN, 2022; KATIĆ et al., 2023; WANG et al., 2022) em decorrência de sua composição química semelhante à parte inorgânica da matriz óssea, composta por hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  ou HA). Devido à sua afinidade química, os fosfatos de cálcio apresentam grande facilidade de se ligarem ao tecido ósseo natural (DOROZHKIN, 2010), favorecendo o fenômeno da osteocondução (direcionamento das células ósseas sobre a superfície ou no interior de poros, tubos ou canais) e da osteoindução (quando algum estímulo, orgânico ou não, leva à diferenciação celular), principalmente quando em escala manométrica (LEGEROS, *et al.*, 2008; WILSON-HENCH, 1987). Apesar de a HA ser a estrutura inorgânica predominante no tecido ósseo, também são encontradas fases como a bruxita ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e o octafosfato de cálcio ( $\text{Ca}_8\text{H}_2[\text{PO}_4]_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Estes e outros fosfatos, como os mostrados na Tabela 3, possuem razão molar Ca/P entre 1 e 2. Segundo Williams (1981), esses fosfatos não são encapsulados pelo tecido fibroso e permitem o crescimento ósseo em direção ao implante. Isso justifica o uso de fosfatos precursores da HA, que podem se converter em HA no corpo humano.

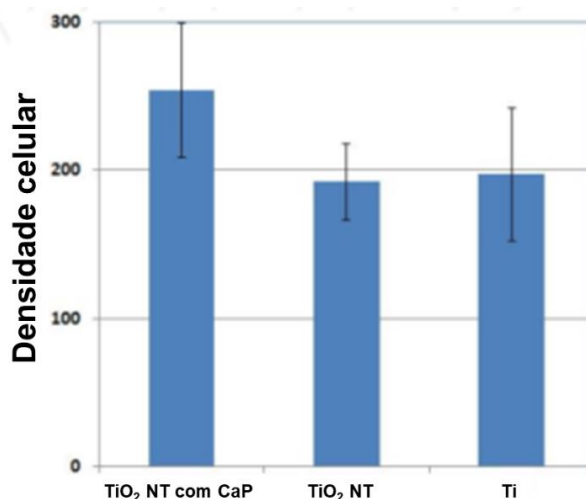
**Tabela 3** - Nome químico, nome mineral e composição de várias cerâmicas de base

CaP	Fórmula		Abreviação
1,00	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de cálcio hidratado / Bruxi	DCP
1,00	$\text{CaHPO}_4$	Fosfato de cálcio anidro / Monetit	ADCP
1,33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Octafosfato de cálcio	OCP
1,50	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Trifosfato de cálcio	TCP
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{F}_2$	Fluorapatita	FA
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$	Hidroxiapatita	HA
2,00	$\text{CaO} \cdot \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Tetrafosfato de cálcio	TTCP

Fonte: Elaborado por Williams (1981).

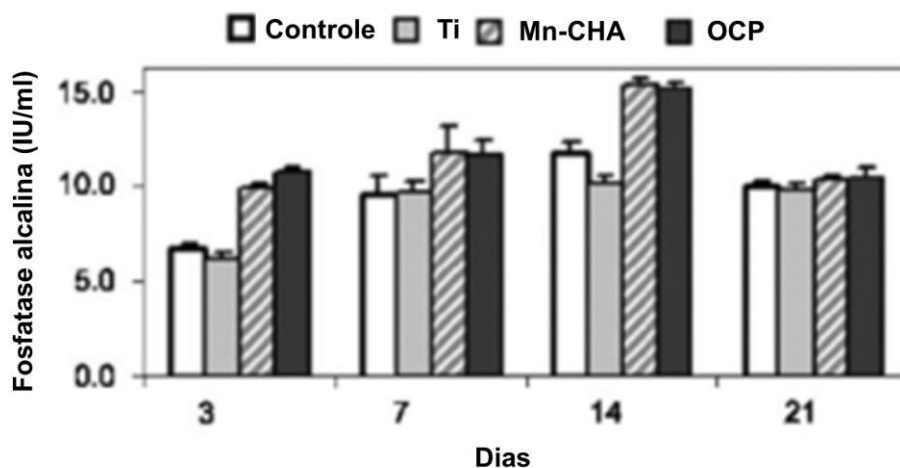
Estudos com recobrimentos contendo CaP sobre superfícies de titânio com diferentes tratamentos mostraram resultados promissores, com melhora na proliferação (PISAREK, 2012) e diferenciação celular (BIGI et al., 2005), como demonstrado nas Figuras 4 e 5.

**Figura 4:** Densidade de células U2OS (osteosarcoma humano) cultivadas durante 44 h sobre recobrimento de CaP depositado em nanotubos de  $\text{TiO}_2$  (20 V), nanotubos de  $\text{TiO}_2$  e substrato de titânio puro.



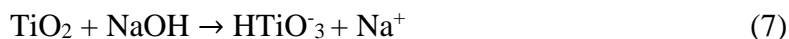
Fonte: Elaborado por Pisarek (2012).

**Figura 5:** Atividade de fosfatase alcalina de células osteoblásticas primárias após cultura em vários substratos até 21 dias. Ti (substrato de Ti puro, altamente polido e quimicamente tratado), com recobrimento Mn-CHA (manganês + hidroxiapatita carbonatada) e OCP (octa fosfato de cálcio)

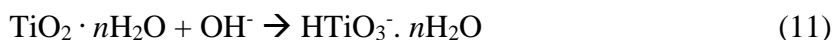
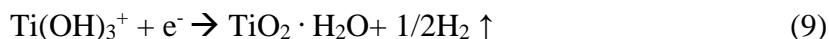
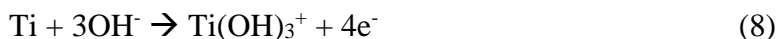


Fonte: Elaborado por Bigi *et al.* (2005).

Embora o processo inicial de formação da HÁ em camadas de TiO<sub>2</sub> seja bem estabelecido, ele depende do tipo de fosfato e da metodologia utilizados. De acordo com a literatura, para os processos de deposição/incorporação de CaP em superfícies de TiO<sub>2</sub>, é comum a preparação prévia da superfície com uma solução de NaOH. Essa preparação tem o objetivo de tornar a superfície mais hidrofílica e promover a atração de íons precursores de HA. De acordo com Kokubo (1996), quando o TiO<sub>2</sub> é submetido ao tratamento alcalino, os íons de Na<sup>+</sup> são liberados no meio e a porção mais externa da camada óxida reage com o OH<sup>-</sup>, formando uma fina camada de titânia amorfa (HTiO<sub>3</sub><sup>-</sup>), conforme a Equação (7).



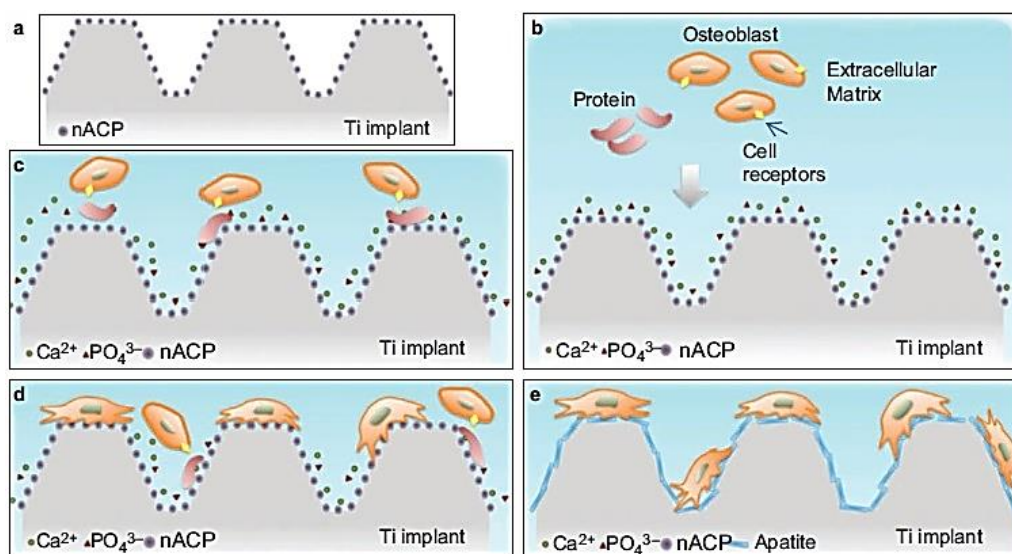
Simultaneamente o Ti metálico reage com OH<sup>-</sup> como mostrado nas seguintes Equações (8 - 11).



O aumento do pH na superfície promove a precipitação de cátions Ca<sup>2+</sup> no Ti-OH, acelerando a nucleação da apatita. Os cátions Ca<sup>2+</sup> adsorvidos, devido à sua carga positiva, atraem os ânions fosfato (PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub><sup>-</sup> e carbonato (CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>-</sup> para a superfície, atuando como sítios de nucleação. Isso resulta na formação de uma camada rica em fosfato de cálcio, que posteriormente se cristaliza em HCA (hidroxiapatita carbonatada), composto quimicamente semelhante ao osso (JONÁŠOVÁ *et al.*, 2004).

Além de precursores da HA, os fosfatos de cálcio atuam como fontes de íons Ca<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> liberando-os ao tecido adjacente, e podem regular funções osteoblásticas (WU *et al.*, 2003). Segundo Legeros (2008) e Koegler *et al.*, (2012), a adsorção e a retenção de agentes indutores da osteogênese, como a proteína morfogenética óssea (BMP), são melhoradas quando o CaP está na forma nanométrica (nCaP). Isso ocorre porque o nCaP apresenta uma área de superfície maior, o que aumenta a fração de sítios de ligação para os receptores celulares. A Figura 6 mostra um exemplo de como o nCaP pode adsorver BMP.

**Figura 6:** Desenho esquemático sobre a resposta biológica em recobrimentos de nACP (nanofosfato de cálcio amorfo) em implantes de titânio. (a) implante recoberto com nACP, (b) liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  and  $(\text{PO}_4)^{3-}$  provenientes da hidrólise de ACP, (c) ligação celular no implante com ajuda de receptores de proteínas e integritinas, (d) proliferação celular na superfície, (e) formação da apatita na superfície.



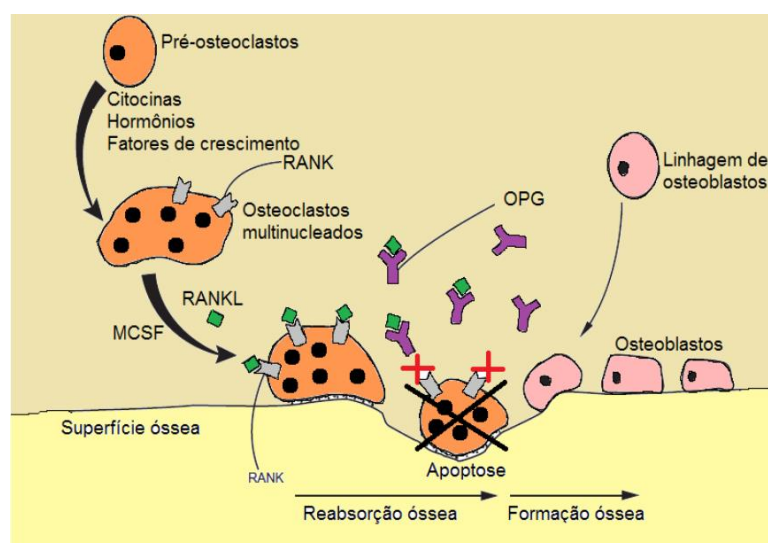
Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (2014).

### 3.3.2 EFEITOS DO RANELATO DE ESTRÔNCIO

Outra funcionalização relevante para este estudo é a adição do ranelato de estrôncio (RSr) à superfície nanoestruturada. Esse fármaco está disponível no mercado desde 2000 e é prescrito para o tratamento da osteoporose, principalmente em mulheres pós-menopáusicas. A osteoporose é uma doença que ocorre quando há um desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. A remodelação óssea é um processo natural que ocorre constantemente para manter a saúde dos ossos. Os osteoblastos são células que produzem novo osso, enquanto os osteoclastos são células que removem o osso velho. Quando a ação dos osteoclastos é maior do que a dos osteoblastos, ocorre uma perda de massa óssea e uma deterioração da microarquitetura do tecido, ocasionando a fragilização do osso. De forma simplificada, os osteoblastos produzem ativadores celulares conhecidos como RANKL (receptor ativador do fator nuclear Kappa-B ligante) e OPG (osteoprotegerina). De acordo com Wittkowske *et al.* (2016), o fator RANKL pode ser produzido nas formas solúvel ou membranosa. A forma membranosa do RANKL pode se ligar ao receptor RANK presente na superfície de células precursoras ou osteoclastos maduros. Isso desencadeia a diferenciação em osteoclastos e/ou a ativação dos osteoclastos maduros, resultando na reabsorção óssea. Por outro lado, a forma

solúvel do RANKL pode se ligar à OPG, impedindo, assim, sua ligação ao receptor RANK. Conseqüentemente, isso inibe a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoclastos, evitando a reabsorção óssea, conforme ilustrado no diagrama esquemático da Figura 7 (BEZERRA, 2016). O RSr também apresenta resultados significativos na prevenção de fraturas ósseas, sendo capaz de acelerar a cicatrização óssea (HABERMANN et al., 2010).

**Figura 7:** Desenho esquemático do sistema RANK/RANKL/OPG no processo de remodelação óssea,

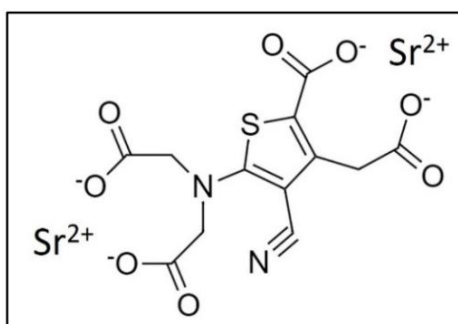


Fonte: Adaptado de Bezerra *et al.* (2016).

O composto RSr é constituído por dois íons de estrôncio e uma molécula de ácido ranélico, conforme ilustrado na Figura 8. O ácido ranélico atua como um carreador orgânico desprovido de atividade farmacológica, sendo prontamente excretado na urina. Após a ingestão, o RSr se dissolve no ambiente de baixo pH gástrico, permitindo que seus íons sejam absorvidos pelo intestino. Em seguida, esses íons atingem a corrente sanguínea e, finalmente, alcançam os ossos. O RSr se destaca no tratamento da osteoporose devido à sua ação dual, conforme representado na Figura 9. Devido à sua afinidade química com o cálcio, o estrôncio tem a capacidade de se ligar aos receptores de cálcio (CaSR) presentes em osteoblastos e osteoclastos. Essa ligação ativa diversas vias de sinalização intracelular, as quais regulam o comportamento e o destino das células ósseas (QUERIDO; *et al.*, 2016). Esta ativação leva a um aumento da OPG e à diminuição da atividade do fator RANKL. Além disso, a ativação da CaSR pelo estrôncio nos osteoblastos promove a sobrevivência, bem como a proliferação e diferenciação dessas células (BRENNAN et al., 2009). Canalis et al. 1996 verificaram que os

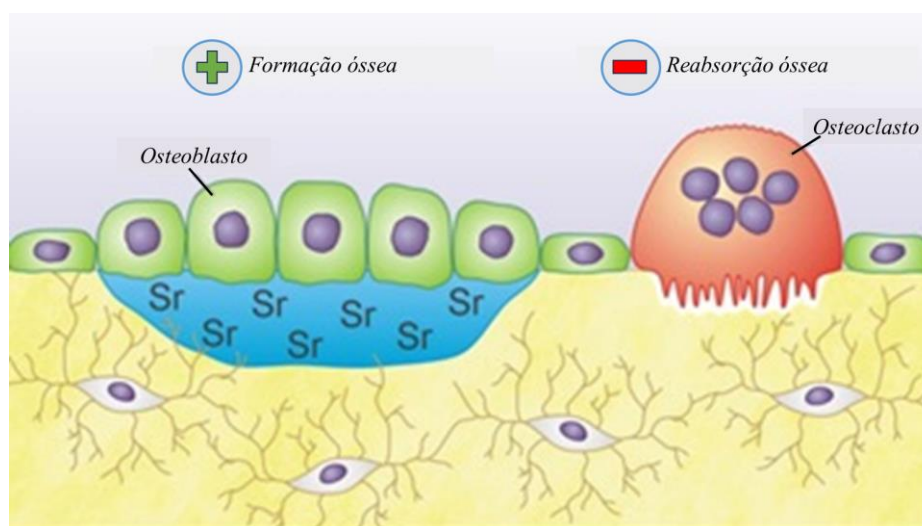
efeitos *in vitro* do estrôncio são únicos quando comparados ao do cálcio e do sódio também ligados ao ranelato. Outro aspecto relacionado ao tratamento com o RSr é a sua possibilidade de adsorção ou substituição dos íons de cálcio pelo estrôncio dentro dos cristais da HA presente no osso (OLIVEIRA et al., 2012). A substituição geralmente ocorre de um átomo de estrôncio para cada dez átomos de cálcio, podendo ocasionar a expansão do parâmetro de rede do cristal (Boivin *et al.*, 1996 e Querido *et al.*, 2016).

**Figura 8:** Estrutura química da molécula do ranelato de estrôncio



Fonte: Borciani *et al.* (2022).

**Figura 9:** Efeito da ação dual do ranelato de estrôncio na matriz óssea.



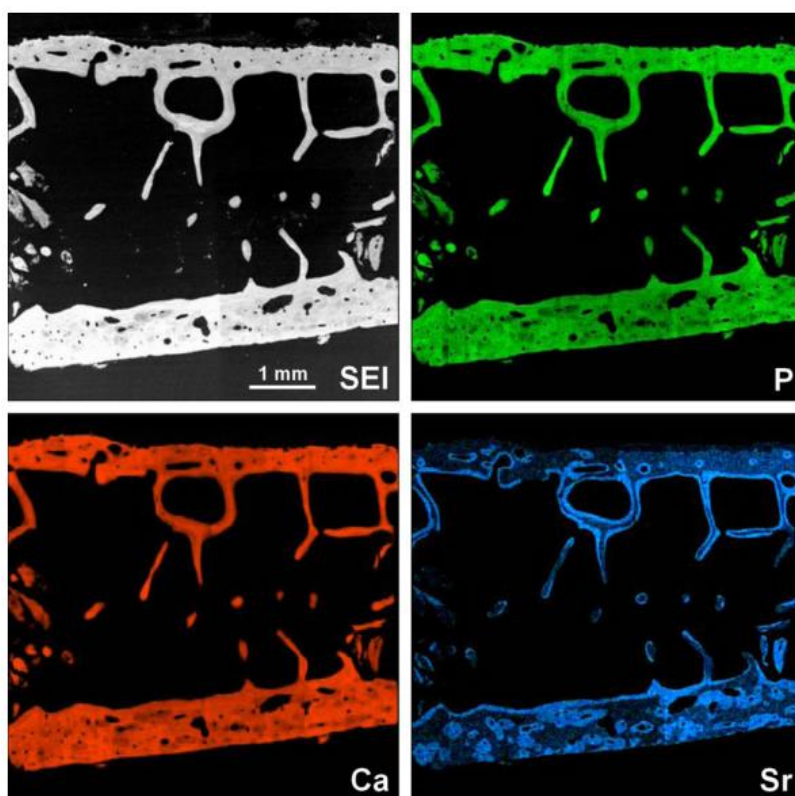
Fonte: Adaptado de Querido *et al.* (2016).

Quanto à administração oral do RSr, é importante mencionar que a quantidade de estrôncio absorvida varia em função do tipo de osso considerado. Em geral, a absorção é mais frequente em ossos trabeculares (esponjosos) do que em ossos corticais (compactos), devido à maior



taxa de renovação dos primeiros (QUERIDO; *et al.*, 2016). Embora seja detectado na matriz óssea antiga após o tratamento, sua presença é mais acentuada nos ossos da nova matriz que se forma durante o processo de remodelação. Adicionalmente, sua distribuição ocorre de forma heterogênea em várias regiões do mesmo osso, conforme demonstrado por Boivin *et al.* (2009) em biópsia óssea de paciente tratada com RSr. Notou-se que os elementos fósforo e cálcio estavam presentes em todo o tecido ósseo. No entanto, a distribuição do estrôncio no osso se revelou variável, como mostrado na Figura 10.

**Figura 10:** Heterogeneidade na distribuição de estrôncio no osso. Imagem de microscopia eletrônica e mapa químico de osso de paciente do sexo feminino após tratamento com RSr.

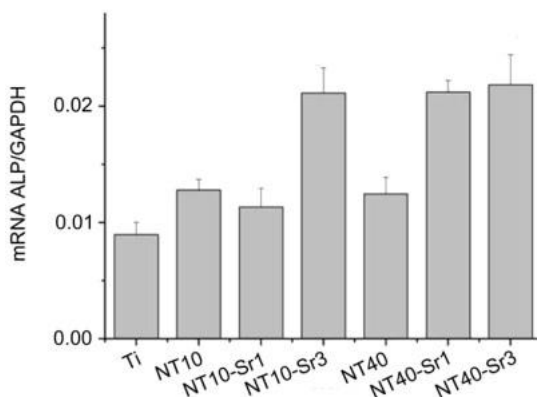


Fonte: Adaptado de Boivin *et al.* (2009) e Querido *et al.* (2016).

Um ponto importante a ser considerado em relação ao RSr é a ocorrência de efeitos colaterais adversos associados ao seu uso, o que resultou em restrições significativas na prescrição oral desse medicamento. O RSr é conhecido por aumentar o potencial de risco cardiovascular e de infartos não fatais. Dessa forma, seu uso tem sido limitado em pacientes com problemas cardíacos. A prescrição do RSr envolve sempre uma avaliação da relação risco/benefício para os pacientes. Devido a essas restrições, as pesquisas relacionadas ao RSr em sua forma oral

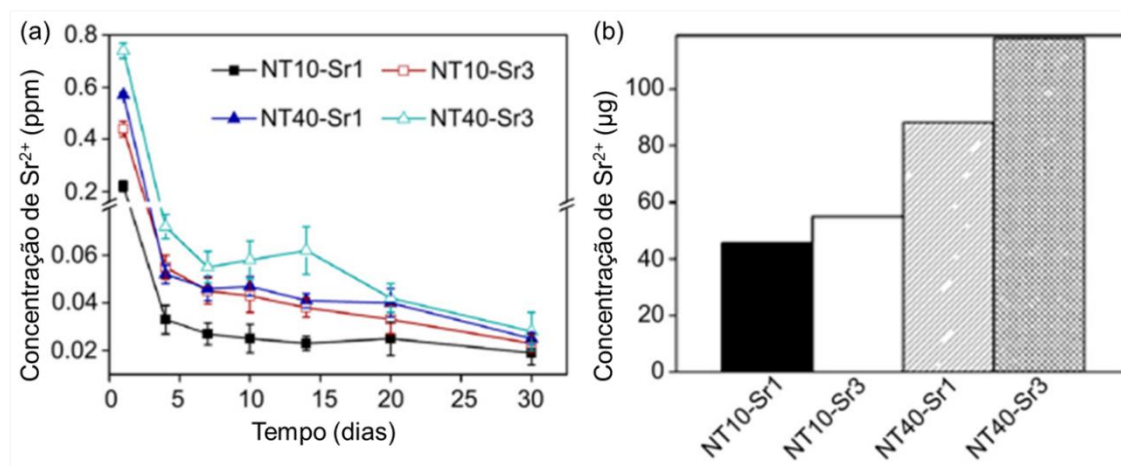
foram desencorajadas a partir de meados de 2014, como apontado por (BORCIANI *et al.*, 2022). Por outro lado, esse fármaco tem encontrado abertura crescente como ferramenta na funcionalização de biomateriais, especialmente no campo da engenharia de tecidos ósseos. Em 2016, Querido e colaboradores conduziram um estudo no qual avaliaram os efeitos deste fármaco em duas concentrações distintas (0,12 mM e 0,50 mM de  $\text{Sr}^{2+}$ ) em células osteoblásticas de camundongos. Essas células foram cultivadas em quatro substratos de titânio que haviam sido preparados com diferentes tratamentos de superfície, incluindo tratamento ácido, eletroerosão, jateamento e usinagem. Os resultados desse estudo revelaram efeitos significativos na proliferação celular e na diferenciação em osteoblastos maduros, bem como na produção de matriz mineral semelhante à óssea, tanto nas concentrações mais baixas quanto nas mais elevadas, em todos os tipos de substratos avaliados. Zhao *et al.* (2013), investigaram o impacto do estrôncio em uma superfície nanotubular de  $\text{TiO}_2$ , a qual foi obtida em um eletrólito orgânico sob diferentes tensões, resultando em nanotubos com diâmetros médios de 30 e 100 nm, respectivamente, sob tensões de 10 e 40 V. O estrôncio foi incorporado nesses nanotubos por meio de um processo hidrotérmico, utilizando uma solução de  $\text{Sr}(\text{OH})_2$  e um tempo de tratamento de 1-3 h. Os resultados obtidos demonstraram que, das quatro superfícies funcionalizadas com estrôncio, três delas exibiram uma notável diferenciação celular em comparação com as superfícies não funcionalizadas, conforme ilustrado na Figura 11. Além disso, o estudo investigou a cinética de liberação do estrôncio pelos nanotubos ao longo de um mês, observando que os nanotubos com diâmetros maiores e tratamentos hidrotérmicos mais longos liberaram o estrôncio de forma mais rápida do que aqueles com diâmetros menores e tratamentos mais curtos. Contudo, após 4 dias, a taxa de liberação tornou-se relativamente constante, indicando um declínio suave. Conforme relatado no estudo, os nanotubos eram capazes de liberar o estrôncio ao longo de um período superior a um ano, como mostrado na Figura 12.

**Figura 11:** Expressão relativa da fosfatase alcalina por células tronco mesenquimais cultivadas em diferentes substratos por duas semanas.



Fonte: Zhao *et al.* (2013).

**Figura 12:** Perfis de tempo de liberação não cumulativa de estrôncio (a) e, conteúdo total de estrôncio (b) dos nanotubos funcionalizados com estrôncio.



Fonte: Zhao *et al.* (2013).

Portanto, é relevante conduzir um estudo sobre o depósito de RSr sobre o sistema Ti/TiO<sub>2</sub> nanotubular por meio do método de imersão. Adicionalmente, a comparação entre substratos de TiO<sub>2</sub> funcionalizados com CaP, RSr e uma combinação destes dois compostos suscita um maior interesse em adquirir uma compreensão mais profunda sobre os benefícios potenciais e quaisquer efeitos adversos relacionados a uma superfície nanoestruturada. Outra análise interessante consiste em comparar essas superfícies funcionalizadas com aquelas que foram submetidas ao tratamento SLA, uma abordagem ainda não foi reportada na literatura. Além disso, é importante destacar que as superfícies testadas representam uma novidade no mercado de implantes odontológicos.

### 3.4 TENDÊNCIAS NA FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE TiO<sub>2</sub>

A partir de uma revisão da literatura, é possível identificar as tendências predominantes em termos de funcionalização de superfícies nanotubulares de TiO<sub>2</sub> utilizadas em implantes osseointegráveis, conforme descrito na Tabela 4. A pesquisa bibliográfica empregou um filtro temporal para limitar a análise aos trabalhos publicados nos últimos dez anos, excluindo aqueles que não eram revisões de literatura. As palavras-chave utilizadas foram: *TiO<sub>2</sub>, titanium dioxide, implant, nanotubes e functionalization*. De maneira geral, as metodologias de funcionalização mais prevalentes nos resultados desta busca atual incluem imersão, anodização, electrodeposição, deposição por rotação assistida e tratamento hidrotérmico. É também notável a frequência da técnica "camada a camada" (também conhecida como *layer by layer*), que visa proporcionar uma liberação controlada, alternando a deposição da substância de interesse com camadas imobilizadoras. No que diz respeito à adição de Sr e compostos CaP, as técnicas mais comuns incluem deposição por pressão negativa, tratamento hidrotérmico e, sobretudo, a eletrodeposição (ou polarização reversa). A última técnica é particularmente interessante, uma vez que geralmente requer um menor tempo de processamento em comparação com as demais.

Além do CaP e Sr, notou-se que várias outras substâncias são utilizadas para funcionalização da superfície de TiO<sub>2</sub> nanotubular, tais como óxido de grafeno, proteína morfogenética óssea humana, peptídeos de crescimento ósseo, polímeros, flúor e muitas outras. Vale destacar o aumento no uso de substâncias com propriedades bactericidas, inclusive a combinação delas com as tradicionalmente testadas, visando aprimorar não apenas o processo de osseointegração em si, mas também prevenir a adesão inicial de micro-organismos e a formação de biofilmes, um fator que pode levar a infecções. Exemplos disso incluem o uso de íons de prata e zinco, além de antibióticos como minociclina e ciprofloxacino. Além disso, observa-se uma busca crescente por diferentes respostas celulares em relação às estruturas nanotubulares, sejam elas relacionadas à osteogênese ou não. Entre as respostas osteogênicas mais relevantes estão o comportamento de fibroblastos gengivais humanos, a expressão de integrinas específicas, como a  $\alpha V\beta_3$ , que desempenham um papel importante na adesão dos osteoblastos, o processo autofágico e a eficácia no contato entre o osso e o implante. No aspecto angiogênico, também se observa um interesse crescente, abrangendo estudos sobre a adsorção de proteínas específicas, como BSA e FIB, que desempenham um papel na inibição

da adesão e agregação plaquetária em resposta à dopagem das superfícies nanotubulares com Zn, bem como o comportamento geral das células endoteliais da corrente sanguínea.

Além dos estudos mencionados anteriormente, é crucial avaliar a integridade e funcionalidade dos dispositivos. Portanto, a pesquisa incluiu avaliações relacionadas à corrosão em ambiente de saliva artificial, tempo de liberação sustentada do implante, força de adesão do filme anódico ao substrato, e atividade antioxidante. No entanto, notou-se que essas avaliações são menos frequentes em comparação com os estudos relacionados à química da superfície e testes biológicos. Essa observação destaca uma certa escassez desse tipo de estudo nos últimos anos. Esses estudos são de extrema importância, uma vez que os dispositivos odontológicos estão sujeitos a solicitações mecânicas cíclicas ao longo de um período prolongado, e os processos de funcionalização podem afetar suas propriedades. Portanto, a avaliação da integridade e funcionalidade dos dispositivos é essencial para garantir a eficácia e a segurança a longo prazo desses implantes.

Outro tema de relevância que até o momento foi pouco explorado é o potencial impacto biológico do fluoreto residual proveniente de eletrólitos inorgânicos nos nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . Isso inclui sua influência nas respostas de proliferação, diferenciação e mineralização celular, bem como seu possível efeito bactericida. Essa análise pode afetar a necessidade ou a exclusão da etapa de esterilização de amostras ou mesmo de implantes. É importante notar que, apesar das diversas técnicas e funcionalizações descritas na literatura, são raros os estudos comparativos entre superfícies nanotubulares funcionalizadas e as obtidas por meio do tratamento SLA.

**Tabela 4:** Revisão da literatura com tendências e funcionalização

Ano	Diâmetro dos nanotubos (nm)	Funcionalização	Metodologia	Caracterização	Principais resultados
Wang <i>et al.</i> (2023)	-	Hidroxiapatita	Pressão negativa e tratamento hidrotérmico	MEV, DRX, força de ligação	Sucesso na síntese de HA sobre NT'S de TiO <sub>2</sub> , aumento da força de ligação do revestimento de HA e do substrato de Ti. HA aumentou a proliferação celular, diferenciação osteogênica in vitro e, melhorou a formação de novos ossos, bem como a osseointegração in vivo.
Simon <i>et al.</i> (2022)	65-72	Prata	Imersão e radiação UV	MEV, DRX e ângulo de contato	A prata promoveu o aumento da atividade antimicrobiana.
Cao <i>et al.</i> , (2022)	100	Óxido de grafeno	Eletrodeposição	MEV, DRX, XPS e ângulo de contato	A proliferação, migração e adesão de fibroblastos gengivais humanos foram significativamente melhoradas.
Iyoon jariya <i>et al.</i> (2022)	-	Hidrocloro de ciprofloxacino, encapsulado em microesferas de vaterita e policaprolactona.	Precipitação, agitação e suspensão	MEV, EDS, DRX, FTIR, Raman, UV-vis, ângulo de contato	Todos os revestimentos apoiaram a viabilidade e proliferação celular. A combinação Vaterita-rGO/PCL apresentou liberação lenta e constante de antibióticos na interface do implante-tecido, sendo promissora para atuar em infecções.

Tang <i>et al.</i> (2022)	60-70	BFP-1 e peptídeos GL13K	Imobilização de peptídeos utilizando dopamina como mecanismo de acoplamento	MEV, AFM, XPS, ângulo de contato, microscopia de fluorescência	Aumento da diferenciação de osteoblastos e atividade antibacteriana para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .
Qiaoxia <i>et al.</i> (2020)	142,23 ±14,52	Hidroxiapatita, ácido tânico	Imersão	MEV, EDS, DRX, FTIR, XPS	O revestimento HA/TA apresentou atividade antioxidante forte e persistente. Testes <i>in vitro</i> mostraram boa citocompatibilidade para proliferação e adesão de osteoblastos.
Yan <i>et al.</i> (2020)	70	Interleucina-4 (IL-4)	Imersão em solução de dopamina e solução de IL-4	MEV, AFM, XPS, ângulo de contato	Os NT's modificados com IL-4 foram benéficos para regular o ambiente inflamatório apropriado.

Pan <i>et al.</i> (2020)	30 e 70	Zinco	Tratamento hidrotérmico	MEV, EDS, XPS, FTIR, ângulo de contato	A dopagem com Zn pode aumentar a hidrofiliabilidade e a capacidade de adsorção das proteínas BSA e FIB. A adsorção de BSA pode efetivamente inibir a adesão de plaquetas e melhorar a compatibilidade sanguínea. Além disso, eleva a expressão de cGMP das plaquetas e inibe a adesão e agregação plaquetária, reduz a taxa de hemólise e melhora a compatibilidade sanguínea.
Es-Souni <i>et al.</i> (2019)	55	Polímero zwitter-iônico antiadesivo	Silanização, imersão e fotoexortia com luz UV	MEV, EDS, DSC, XRD, FTIR, ESB, SPE, ângulo de contato	A camada polimérica cobriu a superfície e as paredes dos NT's. Os filmes funcionalizados apresentaram alta adesão e resistência mecânica. A adesão de proteínas e bactérias ocorre apenas nas listras não funcionalizadas.
Li <i>et al.</i> (2019)	70	Proteína morfogenética óssea humana-2 (hBMP-2)	Deposição e liofilização	MEV, XPS, ângulo de contato	As superfícies hBMP-2/Ti, NT, hBMP-2/NT apresentaram bons resultados em comparação ao Ti. Testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> apresentaram melhores resultados para superfícies com hBMP-2, especialmente hBMP-2/NT.



Wei <i>et al.</i> (2019)	70-100	Proteína morfogenética óssea humana-2 (hBMP-2) e exossomos derivados de macrófagos	Incubação dos exossomos sobre os NT's	TEM, microscopia confocal de varredura a laser	Os nanotubos funcionalizados com exossomos derivados de macrófagos/BMP-2 ativaram a autofagia durante a diferenciação osteogênica.
Yazici <i>et al.</i> (2019)	90	Peptídeo-1 de ligação à hidroxiapatita (HABP-1), peptídeos antimicrobianos (AMP)	Eletrodeposição pulsada com CaP e incubação do AMP sob agitação	MEV, DRX, FTIR	HABP-1 proporcionou uma propriedade de auto revestimento, enquanto o AMP ofereceu uma proteção antimicrobiana à superfície. O peptídeo também resultou na redução do número de bactérias tanto para <i>Escherichia coli</i> quanto para <i>Staphylococcus mutans</i> em comparação com grupos controle.
A <i>et al.</i> (2018)	100-200	Minociclina	Imersão em albumina sérica bovina (BSA) e imersão em solução de minociclina	MEV, HPLC, ângulo de contato	NT's fabricados com 30 V atenderam às necessidades do portador da minociclina. NT's carregados com concentração de 20 µg/mL de minociclina aumentaram a proliferação de células de Schwann e a secreção de fatores neurotróficos <i>in vitro</i> .

Lai <i>et al.</i> (2018)	100	Naringina e quitosana	Gotejamento com naringina e gotejamento por rotação da camada de quitosana	MEV; AFM, XPS, ângulo de contato	O NT's revestidos com naringina e quitosana aumentaram a disseminação, proliferação, atividade da fosfatase alcalina e a mineralização dos osteoblastos em estágio avançado.
Alves <i>et al.</i> (2018)	50-90	Cálcio, fósforo e zinco	Eletrodeposição	MEV, EDS, STM, tribocorrosão, nanoindentação, profilometria, OCP	NT's biofuncionalizados exibiram um desempenho aprimorado de tribocorrosão, aumentou significativamente sua força de adesão ao substrato e sua dureza. Além disso, ocorre a formação de um tribofilme rico em P, que confere proteção eletroquímica e resistência ao desgaste mecânico.
Huang <i>et al.</i> (2018)	-	Proteína morfogenética óssea humana-2 (hBMP-2)	Imobilização de peptídeos utilizando dopamina como mecanismo de acoplamento	MEV	BMSC's incubadas em NT's aumentaram a adesão celular, proliferação celular e diferenciação osteogênica em comparação com substratos de Ti nus. BMSCs aderidas à superfície NT conjugadas com BMP-2 mostraram maior aderência, proliferação celular e diferenciação osteogênica em comparação com células aderidas às superfícies NT's, mostrando que a imobilização de BMP-2 sobre NT's de TiO <sub>2</sub> promoveu significativamente a adesão celular e a diferenciação osteogênica.

Mu <i>et al.</i> (2018)	60-70	Raloxifeno, multicamadas de quitosana e ácido hialurônico com alendronato	Rotação assistida camada por camada	MEV, AFM, XPS, teste de liberação	As multicamadas sobre NT's mantêm a concentração estável de Ral no local do implante mesmo após 192 h. O sistema demonstrou maior atividade de fosfatase alcalina (ALP), mineralização em osteoblastos, bem como menor atividade de fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) em osteoclastos em comparação com NT's de TiO <sub>2</sub> nus e substrato NT/Ral. Além disso, o implante pode aumentar eficientemente a formação de novo osso ao redor e promover a ligação óssea em coelhos osteoporóticos.
Oliveira <i>et al.</i> (2018)	100	Lectina de sementes de Cratylia mollis (Cramol) com camadas alternadas de poli (alilamina) a ácido poli(acrílico)	Camada por camada	MEV, FTIR, AFM, EIS (espectroscopia de impedância eletroquímica)	A lectina não perdeu sua atividade biológica. Houve aumento na adesão celular semelhante a osteoblastos quando comparado às superfícies nuas de NTs. Proliferação celular foi significativa nos substratos com concentrações de Cramol iguais a 80, 160 e 320 µg/mL após 48 h de incubação.
Sutrisno <i>et al.</i> (2018)	70	Quitosana, hialuronato de sódio-ácido láurico e proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2)	Camada por camada assistida por rotação.	FTIR, ressonância magnética nuclear (RMN H-1), MEV, AFM, ângulo de contato, perfil de liberação	O NT carregado com BMP-2 com revestimento multicamada demonstrou boa capacidade antibacteriana e biocompatibilidade no uso <i>in vitro</i> , o que foi apoiado pela inibição eficiente do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> e, maior viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina, capacidade de mineralização e maior expressão gênica de osteoblastos.

Ding <i>et al.</i> (2018)	100	Polidopamina (PDA), nanopartículas de prata e zinco	Polimerização e deposição	MEV, FTIR, XPS, medidas de pH	Este material exibiu boa atividade antibacteriana e seu filme possui menor citotoxicidade celular e melhor biocompatibilidade do que outros filmes de PDA contendo Ag.
Ran <i>et al.</i> (2018)	70	Deferoxamina (DFO), multicamadas de quitosana e gelatina (Gel) como estrutura de cobertura	Camada por camada	MEV, AFM, XPS, ângulo de contato e perfil de liberação	DFO liberado das matrizes de NT de maneira sustentada. Melhorou da adesão, proliferação, diferenciação osteogênica/angiogênica de MSCs e mediu o comportamento de crescimento de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs). Além disso, os substratos regularam positivamente a expressão de genes relacionados à diferenciação osteogênica e angiogênica de MSC.
Yuan <i>et al.</i> (2018)	70	Catecol, ácido hialurônico modificado com dopamina (HA-c) e quitosana modificada com ácido 3,4 di- hidroxihidrocinâmico (Chi-c)	Recobrimento por rotação, camada por camada	MEV, sistema de teste nanomecânico (módulo de Young e dureza), ângulo de contato e perfil de liberação	O substrato apresentou forte hidrofobicidade, inibiu a adesão bacteriana em estágio inicial. Exibiu uma liberação enzimática de droga antibacteriana desencadeada pela degradação da hialuronidase de HA-c, que exibiu capacidade antibacteriana eficaz e eliminou os efeitos colaterais causados pela liberação repentina de antibióticos. Os substratos promoveram significativa adesão inicial dos osteoblastos através da regulação positiva da expressão de genes relacionados com a adesão, incluindo as integrinas $\alpha v$ e $\beta 3$ , bem como a osseointegração e preveniu a infecção bacteriana de implantes de Ti <i>in vivo</i> .

---

Yuan <i>et al.</i> (2018)	70	Nanopartículas de prata, quitosana (chi), aglinato de dialdeído (ada)	Radiação UV, deposição camada por camada	FE-MEV, TSM, ângulo de contato, espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES)	Os substratos com multicamadas (ADACHI)10 têm citotoxicidade insignificante e promovem o crescimento de osteoblastos em comparação com NT-Ag. As amostras exibiram atividade antibacteriana proeminente para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> . A plataforma fabricada incorporada em prata foi capaz de inibir a adesão e o crescimento de bactérias.
Alves <i>et al.</i> (2017)	120	Zinco, cálcio e fósforo	Polarização reversa	MEV, EDS, FIB, MET	Zn, Ca e P foram incorporados com distribuição uniforme. A anodização de NT's de TiO <sub>2</sub> em eletrólitos aquosos induz o crescimento de uma película óxida de 230–250nm na interface Ti/TiO <sub>2</sub> , que parece melhorar as características interfaciais, sugerindo adesão. Esse filme interfacial de óxido é preenchido por Ca, P e Zn, no entanto, esses elementos parecem estar distribuídos de maneira não uniforme em toda a extensão do filme, com Ca na região superficial. O filme óxido melhora a força de ligação do filme nanotubular ao substrato de Ti, um fator crítico que determina a estabilidade biomecânica de um implante e, portanto, seu sucesso a longo prazo.

---

---

Alves <i>et al.</i> (2017)	50-90	Zinco, cálcio e fósforo	Polarização reversa	MEV, EDS, FIB, MET, experimento tribo-eletrouímico com saliva artificial, perfilometria	Os NT's biofuncionalizados apresentam maior resistência ao desgaste e suportam solicitações mecânicas durante 1000s sem desprendimento total do filme. O melhor comportamento tribo-eletrouímico dos NT's biofuncionalizados é devido ao filme de óxido cultivado na interface Ti/ TiO <sub>2</sub> , que concede estabilidade eletrouímica e melhora a força de adesão do filme ao substrato de Ti, resultando em uma perda reduzida de volume de desgaste.
Chen <i>et al.</i> (2017)	100	Ag e Sr	Deposição de TiAg sobre o Ti por sputtering com corrente direta pulsada. Anodização do TiAg e posterior tratamento hidrotérmico para incorporar o Sr.	MEV, EDS, XPS, DRX, TEM e liberação.	Ti-Sr-Ag libera constantemente Sr <sup>2+</sup> e Ag <sup>+</sup> . O tratamento hidrotérmico não altera a morfologia dos NT's, mas converte o TiO <sub>2</sub> amorfo do NT-Ag em SrTiO <sub>3</sub> cúbico. Durante o processo, NP's de Ag <sub>2</sub> O são incorporados à estrutura. NT-Sr-Ag possui atividade antibacteriana de longa duração contra <i>Staphylococcus aureus</i> devido à liberação sustentada de Ag <sup>+</sup> e exibe boas atividades osteogênicas e angiogênicas devido à liberação controlável e de longo prazo de Sr <sup>2+</sup> . NT-2Sr-Ag e NT-3Sr-Ag apresentam boas atividades antibacteriana, osteogênica e angiogênica e têm potencial clínico em implantes de tecido duro.

---

---

Lai <i>et al.</i> (2017)	70	Peptídeo de crescimento osteogênico e camada de polidopamina	Imersão em polidopamina como intermediário e posteriormente no peptídeo de crescimento osteogênico	MEV, AFM, XPS, ângulo de contato.	Os NT'S com OGP foram favoráveis para a disseminação celular. No entanto, não houve diferença significativa na proliferação celular entre os diferentes grupos. NT's de TiO <sub>2</sub> /OGP apresentaram níveis significativamente elevados de fosfatase alcalina (ALP) e mineralização após 4, 7 e 14 dias de cultura, respectivamente. Células cultivadas em NT's de TiO <sub>2</sub> /OGP tiveram expressão significativamente maior de genes relacionados à osteogênese após 14 dias de cultura.
Alves <i>et al.</i> (2017)	74,1 ± 13,7	Cálcio e fósforo.	Polarização reversa	MEV, EDS, XPS, FTIR, ângulo de contato, interferometria de luz branca,	A análise química confirmou a presença dos compostos CaCO <sub>3</sub> , Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , CaHPO <sub>4</sub> e CaO. NT's funcionalizados por polarização reversa apresentaram melhor adesão e proliferação celular em comparação ao titânio liso. Além disso, estas superfícies apresentaram uma corrente passiva significativamente menor na saliva artificial e, portanto, potencial para minimizar a sua biodegradação em processos de corrosão.

---

---

Shen <i>et al.</i> (2016)	70	Cecropina B, quitosana, hialuronato de sódio	Camada por camada assistida por rotação.	MEV (FIB), AFM, ângulo de contato, perfil de liberação.	A presença de <i>S. aureus</i> e/ou hialuronidase exógena desencadeou efetivamente a degradação de multicamadas, facilitando assim a liberação de CecB dos NT's. Os substratos TNT – CecB – LBLc apresentaram boa capacidade antibactericida precoce (4 h) e a longo prazo (72 h) contra <i>S. aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> . Além disso, os substratos tinham citocompatibilidade relativamente boa para osteoblastos, mesmo cocultura com <i>S. aureus</i> .
Shayganpour <i>et al.</i> (2015)	100-200	Formação da camada NT em pinos odontológicos, magnésio.	Anodização	MEV, EDS, RAMAN	O aparecimento de NT's nos implantes confirma que a titânia porosa anódica pode ser obtida não apenas em titânio ultrapuro e plano, mas também como revestimento em superfícies curvas de objetos reais feitos de ligas industriais de titânio. A fase de titânia obtida é anatase. Realizando a anodização na presença de aditivos eletrolíticos como o magnésio, estes podem ser incorporados no revestimento poroso.

---



---

Lozano <i>et al.</i> (2015)	20 e 100	Fluoreto	Anodização	MEV	O F incorporado nos filmes de óxido nanoestruturados foi de 6 % em nanoporos e 4 % em nanotubos respectivamente, enquanto para o filme barreira de fluor, foi de 12 a %. As células MC3T3-E1 exibiram comportamento diferente nessas superfícies. Assim, filmes de TiO <sub>2</sub> dopados com F com estruturas NP aumentaram a proliferação, bem como a expressão gênica osteogênica e a capacidade de mineralização dessas células osteoblásticas.
Ma <i>et al.</i> (2015)	70	Sequência peptídica de 21 aminoácidos da proteína morfogenética óssea (BMP-2)	Polidopamina como intermediária para imobilização sequência peptídica	XPS, FTIR, ângulo de contato, microscopia de fluorescência,	Os resultados mostraram um aumento significativo no contato osso-implante, na quantidade de fluorescência e nos níveis de expressão gênica do osso fixado aos implantes com o peptídeo de articulação BMP-2 imobilizado em comparação com os outros dois grupos de controle.
Park <i>et al.</i> (2014)	70	NT's de carbono sobre os NT's de titânio	Deposição eletroforética	UV-Vis, MEV, AFM, EDX, DRX,	A biocompatibilidade foi melhorada através do efeito combinado dos NT's de carbono sobre os NT's de TiO <sub>2</sub> , que aumentou a rugosidade da superfície, acelerou a formação de HA e promoveu a proliferação celular.

---

### 3.5 REFERÊNCIAS

- A, L. et al. Surface functionalization of TiO<sub>2</sub> nanotubes with minocycline and its in vitro biological effects on Schwann cells. *BioMedical Engineering Online*, v. 17, n. 1, 20 jun. 2018.
- AGUIRRE OCAMPO, R. et al. Effect of TiO<sub>2</sub> nanotubes size, heat treatment, and UV irradiation on osteoblast behavior. *Materials Chemistry and Physics*, v. 275, p. 125137, jan. 2022.
- ALVES, S. A. et al. Tribo-electrochemical behavior of bio-functionalized TiO<sub>2</sub> nanotubes in artificial saliva: Understanding of degradation mechanisms. *Wear*, v. 384–385, p. 28–42, 2017a.
- ALVES, S. A. et al. Synthesis of calcium-phosphorous doped TiO<sub>2</sub> nanotubes by anodization and reverse polarization: A promising strategy for an efficient biofunctional implant surface. *Applied Surface Science*, v. 399, p. 682–701, mar. 2017b.
- ALVES, S. A. et al. A first insight on the bio-functionalization mechanisms of TiO<sub>2</sub> nanotubes with calcium, phosphorous and zinc by reverse polarization anodization. *Surface and Coatings Technology*, v. 324, p. 153–166, 15 set. 2017c.
- ALVES, S. A. et al. Improved tribocorrosion performance of bio-functionalized TiO<sub>2</sub> nanotubes under two-cycle sliding actions in artificial saliva. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 80, p. 143–154, abr. 2018.
- BAUER, S.; KLEBER, S.; SCHMUKI, P. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Tailoring the geometry in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/HF electrolytes. *Electrochemistry Communications*, v. 8, n. 8, p. 1321–1325, ago. 2006.
- BEZERRA, A. Efeito do ranelato de estrôncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos murinos in vitro. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2016.
- BIGI, A. et al. Human osteoblast response to pulsed laser deposited calcium phosphate coatings. *Biomaterials*, v. 26, n. 15, p. 2381–2389, maio 2005.
- BOIVIN, G. et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 11, n. 9, p. 1302–1311, 3 dez. 2009.
- BORCIANI, G. et al. Strontium Functionalization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering Purposes: A Biological Point of View. *Materials*, v. 15, n. 5, p. 1724, 25 fev. 2022a.
- BORCIANI, G. et al. Strontium Functionalization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering Purposes: A Biological Point of View. *Materials*, v. 15, n. 5, p. 1724, 25 fev. 2022b.
- BOYAN, B. D. et al. Osteoblast-Mediated Mineral Deposition in Culture is Dependent on Surface Microtopography. *Calcified Tissue International*, v. 71, n. 6, p. 519–529, 1 dez. 2002.
- BRÅNEMARK, P. I. ; A. R. ; B. U. ; H. B. O. ; L. J. ; O. A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. Experimental studies. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 3, p. 81–100, 1969.

- BRENNAN, T. et al. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *British Journal of Pharmacology*, v. 157, n. 7, p. 1291–1300, ago. 2009.
- CANALIS, E. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*, v. 18, n. 6, p. 517–523, jun. 1996.
- CAO, X. et al. Graphene Oxide Loaded on TiO<sub>2</sub>-Nanotube-Modified Ti Regulates the Behavior of Human Gingival Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 15, 1 ago. 2022.
- CHEN, Y. et al. Antibacterial, osteogenic, and angiogenic activities of SrTiO<sub>3</sub> nanotubes embedded with Ag<sub>2</sub>O nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, v. 75, p. 1049–1058, 1 jun. 2017.
- DAS, K.; BOSE, S.; BANDYOPADHYAY, A. TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 90A, n. 1, p. 225–237, jun. 2009.
- DING, X. et al. Rapid mussel-inspired synthesis of PDA-Zn-Ag nanofilms on TiO<sub>2</sub> nanotubes for optimizing the antibacterial activity and biocompatibility by doping polydopamine with zinc at a higher temperature. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 171, p. 101–109, nov. 2018.
- DOROZHKIN, S. V. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 12, p. 4457–4475, dez. 2010.
- ELIAS, C. N. et al. Biomedical applications of titanium and its alloys. *JOM*, v. 60, n. 3, p. 46–49, 25 mar. 2008.
- ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials*, v. 10, n. 4, p. 334, 24 mar. 2017.
- ES-SOUNI, M. et al. Processing of nanotubes on NiTi-shape memory alloys and their modification with photografted anti-adhesive polymer brushes. Towards smart implant surfaces. *Materials and Design*, v. 182, 15 nov. 2019.
- HABERMANN, B. et al. Strontium Ranelate Enhances Callus Strength More Than PTH 1-34 in an Osteoporotic Rat Model of Fracture Healing. *Calcified Tissue International*, v. 86, n. 1, p. 82–89, 4 jan. 2010.
- HUANG, Y. et al. Bone Morphogenetic Protein-2 Immobilized on Titanium Oxide Nanotubes Promotes Rat Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, v. 8, n. 9, p. 1342–1347, 1 set. 2018.
- IYNOON JARIYA, S. A. et al. Development of a novel smart carrier for drug delivery: Ciprofloxacin loaded vaterite/reduced graphene oxide/PCL composite coating on TiO<sub>2</sub> nanotube coated titanium. *Ceramics International*, v. 48, n. 7, p. 9579–9594, 1 abr. 2022.
- JAIN, C. ; K. M. ; W. A. ; A. M. ; A. A. Comparative evaluation of osseointegration between sandblasted large grit, acid etched (SLA) and calcium phosphate coated implants. A randomized controlled clinical trial. *Journal of Osseointegration*, v. 14, n. 2, p. 112–121, 2022.
- JONÁŠOVÁ, L. et al. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials*, v. 25, n. 7–8, p. 1187–1194, mar. 2004.

- KATIĆ, J. et al. Titanium Implant Alloy Modified by Electrochemically Deposited Functional Bioactive Calcium Phosphate Coatings. *Coatings*, v. 13, n. 3, p. 640, 17 mar. 2023.
- KAZEMI, M. T. M. H. M. Acceleration of Bone-Implant Graft by Optimizing the Dimension and Crystalline Structure of Titanium Oxide Nanotubes as the Titanium-Based Implant Coating. *Iranian Journal of Materials and Engineering*, v. 20, n. 2, 2023.
- KLEIN, M. O. et al. Long-term response of osteogenic cells on micron and submicron-scale-structured hydrophilic titanium surfaces: sequence of cell proliferation and cell differentiation. *Clinical Oral Implants Research*, v. 21, n. 6, p. 642–649, 19 mar. 2010.
- KOBAYASHI, M. et al. The Effect of Ultraviolet Treatment on TiO<sub>2</sub> Nanotubes: A Study of Surface Characteristics, Bacterial Adhesion, and Gingival Fibroblast Response. *Metals*, v. 12, n. 1, p. 80, 4 jan. 2022.
- KOGLER, P. et al. The influence of nanostructured materials on biointerfacial interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, n. 15, p. 1820–1839, dez. 2012.
- KOKUBO, T. Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process. *Thermochimica Acta*, v. 280, p. 479-490, 1996.
- LAI, M. et al. The controlled naringin release from TiO<sub>2</sub> nanotubes to regulate osteoblast differentiation. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 33, n. 5, p. 673–680, 2 nov. 2018.
- LAI, M.; JIN, Z.; SU, Z. Surface modification of TiO<sub>2</sub> nanotubes with osteogenic growth peptide to enhance osteoblast differentiation. *Materials Science and Engineering C*, v. 73, p. 490–497, 1 abr. 2017.
- LAWSON, A. C.; CZERNUSZKA, J. T. Collagen-calcium phosphate composites. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, v. 212, n. 6, p. 413–425, 1 jun. 1998.
- LEGEROS, R. Z. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chemical Reviews*, v. 108, n. 11, p. 4742–4753, 12 nov. 2008.
- LI, Y. et al. Surface immobilization of TiO<sub>2</sub> nanotubes with bone morphogenetic protein-2 synergistically enhances initial preosteoblast adhesion and osseointegration. *BioMed Research International*, v. 2019, 2019.
- LOSSDÖRFER, S. et al. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 70A, n. 3, p. 361–369, 1 set. 2004.
- LOZANO, D. et al. Influence of the nanostructure of F-doped TiO<sub>2</sub> films on osteoblast growth and function. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 103, n. 6, p. 1985–1990, 1 jun. 2015.
- MA, Y. et al. Nanotubes Functionalized with BMP2 Knuckle Peptide Improve the Osseointegration of Titanium Implants in Rabbits. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 11, n. 2, p. 236–244, 1 fev. 2015.
- MACAK, J. M.; SCHMUKI, P. Anodic growth of self-organized anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes in viscous electrolytes. *Electrochimica Acta*, v. 52, n. 3, p. 1258–1264, nov. 2006.
- MARCHEZINI, E. Estudo da modificação de superfície por oxidação anódica aplicada a titânio para implantes osseointegráveis”. Belo Horizonte: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2015.

MARCHEZINI, E. Estudo das propriedades morfológicas e avaliação in vitro de um recobrimento nanoestruturado de TiO<sub>2</sub> obtido por oxidação anódica de titânio. Belo Horizonte: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2020.

MARCHEZINI, E. et al. Controlling morphological parameters of a nanotubular TiO<sub>2</sub> coating layer prepared by anodic oxidation. *Materials Research Express*, v. 7, n. 2, p. 025017, 1 fev. 2020.

MARCHEZINI, E. et al. Comparative Study of Nanostructured TiO<sub>2</sub> and SLA Surface Modifications for Titanium Implants: Surface Morphology and in vitro Evaluation. *Materials Research*, v. 25, 2022.

MENDONÇA, G. et al. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials*, v. 30, n. 25, p. 4053–4062, set. 2009.

MINAGAR, S. et al. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 8, p. 2875–2888, ago. 2012.

MU, C. et al. Sustained raloxifene release from hyaluronan-alendronate-functionalized titanium nanotube arrays capable of enhancing osseointegration in osteoporotic rabbits. *Materials Science and Engineering C*, v. 82, p. 345–353, 1 jan. 2018.

NEGRESCU, A.-M. et al. TiO<sub>2</sub> Nanotubes Functionalized with Icariin for an Attenuated In Vitro Immune Response and Improved In Vivo Osseointegration. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 13, n. 2, p. 43, 14 abr. 2022.

OH, S. et al. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 78A, n. 1, p. 97–103, jul. 2006.

OH, S. et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 7, p. 2130–2135, 17 fev. 2009.

OLIVEIRA, J. P. et al. Strontium Is Incorporated in Different Levels into Bones and Teeth of Rats Treated with Strontium Ranelate. *Calcified Tissue International*, v. 91, n. 3, p. 186–195, 18 set. 2012.

OLIVEIRA, W. F. et al. Titanium dioxide nanotubes functionalized with Cratylia mollis seed lectin, Cramoll, enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. *Materials Science and Engineering C*, v. 90, p. 664–672, 1 set. 2018.

ORÉFICE, R. P. M. M. H. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. [s.l.] Cultura Médica, 2012a.

ORÉFICE, R. P. M. M. H. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. [s.l.] Cultura Médica, 2012b.

PAN, C. et al. Improved Blood Compatibility and Endothelialization of Titanium Oxide Nanotube Arrays on Titanium Surface by Zinc Doping. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, v. 6, n. 4, p. 2072–2083, 13 abr. 2020.

PARK, J. E. et al. Electrophoretic deposition of carbon nanotubes over TiO<sub>2</sub> nanotubes: Evaluation of surface properties and biocompatibility. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, v. 2014, 2014.

PISAREK, M. ; R. A. ; M. L. ; A. M. Biomimetic and Electrodeposited Calcium-Phosphates Coatings on Ti: formation, surface characterization, biological response. In: HUDAK, R. (Ed.). *Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine*. [s.l.] InTech, 2012.

- QIAOXIA, L. et al. Hydroxyapatite/tannic acid composite coating formation based on Ti modified by TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 196, 1 dez. 2020.
- QUERIDO, W.; FARINA, M.; ANSELME, K. Strontium ranelate improves the interaction of osteoblastic cells with titanium substrates: Increase in cell proliferation, differentiation and matrix mineralization. *Biomatter*, v. 5, n. 1, p. e1027847, 15 jan. 2015.
- QUERIDO, W.; ROSSI, A. L.; FARINA, M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. *Micron*, v. 80, p. 122–134, jan. 2016a.
- QUERIDO, W.; ROSSI, A. L.; FARINA, M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. *Micron*, v. 80, p. 122–134, jan. 2016b.
- RAN, Q. et al. Deferoxamine loaded titania nanotubes substrates regulate osteogenic and angiogenic differentiation of MSCs via activation of HIF-1 $\alpha$  signaling. *Materials Science and Engineering C*, v. 91, p. 44–54, 1 out. 2018.
- RIVERA-CHACON, D. M. et al. Fibronectin and Vitronectin Promote Human Fetal Osteoblast Cell Attachment and Proliferation on Nanoporous Titanium Surfaces. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 9, n. 6, p. 1092–1097, 1 jun. 2013.
- ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO<sub>2</sub> Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 50, n. 13, p. 2904–2939, 21 mar. 2011.
- SANTOS-COQUILLAT, A. et al. Hybrid functionalized coatings on Metallic Biomaterials for Tissue Engineering. *Surface and Coatings Technology*, v. 422, 25 set. 2021.
- SCHWARTZ, Z. et al. Mechanisms regulating increased production of osteoprotegerin by osteoblasts cultured on microstructured titanium surfaces. *Biomaterials*, v. 30, n. 20, p. 3390–3396, jul. 2009.
- SHAYGANPOUR, A. et al. Electrochemical coating of dental implants with anodic porous titania for enhanced osteointegration. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 6, n. 1, p. 2183–2192, 2015.
- SHEN, X. et al. Cecropin B loaded TiO<sub>2</sub> nanotubes coated with hyaluronidase sensitive multilayers for reducing bacterial adhesion. *Materials and Design*, v. 92, p. 1007–1017, 15 fev. 2016.
- SIMON, A. P. et al. Optimization of TiO<sub>2</sub> coatings properties and photochemical Ag-functionalization: Implications on bioactivity and antibacterial activity. *Journal of Materials Research*, v. 37, n. 23, p. 4243–4254, 14 dez. 2022.
- STRAUMANN. Evidências Científicas - Análise científica da superfície de implante Straumann® SLA®. [s.l: s.n.].
- SUTRISNO, L. et al. Fabrication of hyaluronidase-responsive biocompatible multilayers on BMP2 loaded titanium nanotube for the bacterial infection prevention. *Materials Science and Engineering C*, v. 89, p. 95–105, 1 ago. 2018.
- TANG, Q. et al. Bi-functionalization of titanium with a mixture of peptides for improving its osteogenic and antibacterial activity. *Colloids and Interface Science Communications*, v. 51, 1 nov. 2022.

- WANG, F. et al. Tantalum coated on titanium dioxide nanotubes by plasma spraying enhances cytocompatibility for dental implants. *Surface and Coatings Technology*, v. 382, p. 125161, jan. 2020.
- WANG, L. et al. Amorphous Precursor-Mediated Calcium Phosphate Coatings with Tunable Microstructures for Customized Bone Implants. *Advanced Healthcare Materials*, v. 11, n. 19, 27 out. 2022.
- WANG, P. et al. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. *Bone Research*, v. 2, n. 1, p. 14017, 30 set. 2014.
- WANG, Y. et al. Biological properties of hydroxyapatite coatings on titanium dioxide nanotube surfaces using negative pressure method. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 111, n. 7, p. 1365–1373, 24 jul. 2023.
- WEBSTER, T. J.; EJIORFOR, J. U. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials*, v. 25, n. 19, p. 4731–4739, ago. 2004.
- WEI, F. et al. Exosome-integrated titanium oxide nanotubes for targeted bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, v. 86, p. 480–492, 1 mar. 2019.
- WEITZEL, A. P. Funcionalização da camada nanoporosa de TiO<sub>2</sub> obtida por anodização via deposição de compostos de fosfato de cálcio. Belo Horizonte: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2017.
- WILLIAMS, D. F. *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*. [s.l.: s.n.].
- WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, jul. 2008.
- WILSON-HENCH, J. Osteoinduction. Definitions in biomaterials. *Progress in biomedical engineering*, v. 4, p. 29, 1987.
- WITTKOWSKE, C. et al. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 4, 15 nov. 2016.
- WU, X. et al. Requirement of calcium and phosphate ions in expression of sodium-dependent vitamin C transporter 2 and osteopontin in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1641, n. 1, p. 65–70, jun. 2003.
- YAN, X. et al. IL-4 functionalized titanium dioxide nanotubes modulate the inflammatory response of macrophages. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 31, n. 17, p. 2238–2251, 21 nov. 2020.
- YAO, C.; WEBSTER, T. J. Anodization: A Promising Nano-Modification Technique of Titanium Implants for Orthopedic Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, n. 9, p. 2682–2692, 1 set. 2006.
- YAZICI, H. et al. Self-assembling antimicrobial peptides on nanotubular titanium surfaces coated with calcium phosphate for local therapy. *Materials Science and Engineering C*, v. 94, p. 333–343, 1 jan. 2019.
- YUAN, Z. et al. Surface engineering of titanium implants with enzyme-triggered antibacterial properties and enhanced osseointegration: In vivo. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 6, n. 48, p. 8090–8104, 2018a.

YUAN, Z. et al. Construction of Ag-incorporated coating on Ti substrates for inhibited bacterial growth and enhanced osteoblast response. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 171, p. 597–605, 1 nov. 2018b.

ZHAO, L. et al. The osteogenic activity of strontium loaded titania nanotube arrays on titanium substrates. *Biomaterials*, v. 34, n. 1, p. 19–29, jan. 2013.



#### 4. ESTUDO COMPARATIVO DA DEPOSIÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO EM SUBSTRATOS DE TITÂNIO NANOTUBULARES E JATEADOS COM GRÃOS GRANDES E ATAQUE ÁCIDO

Neste estudo, foram investigadas as propriedades morfológicas e químicas das superfícies SLA e NT antes e após a deposição de compostos CaP pelo método de conversão química em solução supersaturada de cálcio (SCS) a 37 °C por 12 e 24 h. Observou-se que os compostos CaP favorecem a deposição de HA no tecido ósseo e se mostram como uma ótima opção na funcionalização em superfícies odontológicas. A superfície SLA apresentou maior rugosidade. O comportamento hidrofílico foi aprimorado em ambas as amostras após a imersão em uma solução alcalina contendo NaOH e a subsequente conversão química. A superfície NT mostrou evidências de uma maior quantidade de deposição e exibiu uma topografia e composição química na superfície que são vantajosas para sua aplicação em implantes. Os testes *in vitro* realizados nas amostras preparadas demonstraram alta viabilidade celular e ausência de toxicidade. Em particular, a superfície NT/SCS exibiu uma diferenciação e mineralização superiores.

**Publicado** em Surface & Coatings Technology (volume 473, 130036, 2023).

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2023.130036>

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O titânio (Ti) e suas ligas têm sido amplamente empregados em aplicações biomédicas nas últimas décadas, devido à sua notável resistência à corrosão, biocompatibilidade, baixa densidade e elevado módulo de elasticidade [1]. Entretanto, foi relatado que o titânio exibe uma considerável inércia biológica, o que pode resultar em um processo lento e deficiente de osseointegração, assim como na possibilidade de perda do implante com o passar do tempo [2,3]. Com o propósito de superar essa desvantagem, os implantes à base de Ti frequentemente passam por tratamentos superficiais, a fim de aumentar sua rugosidade, promover a deposição óssea e melhorar a capacidade de osseointegração [4,5]. Diversas estratégias têm sido empregadas com esse objetivo, tais como condicionamento ácido, jateamento de areia, oxidação anódica, oxidação por plasma eletrolítico e micro-usinagem [6–9]. Entre essas técnicas, a combinação de ataque ácido e jateamento de areia é comumente

utilizada para criar uma superfície microrrugosa conhecida como SLA (sandblasting, large grit, acid etching). Os implantes SLA têm demonstrado uma integração óssea mais rápida em comparação com superfícies lisas, devido ao aumento do contato entre o osso e o implante e à ancoragem mecânica proporcionada pela sua microrrugosidade [6]. Outro método promissor é a oxidação anódica (OA), que permite a formação de uma camada nanotubular (NT) de  $\text{TiO}_2$  em superfícies de Ti comerciais. Os nanotubos podem promover a diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em osteoblastos [10], aumentar a proliferação e mineralização de osteoblastos [11], bem como induzir vasodilatação [12]. Além disso, os nanotubos de  $\text{TiO}_2$  podem servir como veículos para fármacos, prevenir a adesão bacteriana e inibir a ocorrência de hemorragias [13,14]. O comprimento e a largura dos nanotubos de  $\text{TiO}_2$  podem ser ajustados através da variação de parâmetros de anodização, como a tensão aplicada, a composição eletrolítica, o pH da solução e o tempo de anodização [15,16]. Devido a essa versatilidade, as superfícies SLA e OA têm recebido considerável atenção nos últimos anos. Além disso, esses materiais podem ser fabricados de maneira econômica e com processos relativamente simples [17–20]. Para melhorar a eficácia das modificações físicas nas superfícies de Ti, compostos de fosfato de cálcio (CaP) foram depositados sobre este material. Dentre os métodos comumente utilizados, a conversão química têm sido estudada [21,22]. Devido à sua semelhança química com a fase inorgânica do osso, os compostos CaP podem estimular o processo de diferenciação osteogênica e atuar como fonte de íons incluindo  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Tais espécies, quando liberadas nos tecidos adjacentes ao implante, podem regular as funções osteoblásticas [23], levando a uma supersaturação iônica local e causando a formação de apatita carbonatada [24]. O CaP é conhecido por ser atóxico e biocompatível, degrada-se naturalmente no corpo humano e ser espontaneamente substituído por tecido vivo ao longo do tempo.

Este estudo caracteriza duas superfícies de Ti, a saber, SLA e NT, e também investiga o impacto da imersão em uma solução de calcificação supersaturada (SCS). Os materiais preparados foram submersos em SCS a 37 °C por 12 h ou 24 h. As mudanças resultantes na morfologia da superfície, composição química e molhabilidade foram investigadas por uma variedade de técnicas analíticas, incluindo microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia de força atômica (AFM), medidas de ângulo de contato com a água, avaliação da microdureza Vicker, difração de raios X com incidência rasante (GIXRD) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). Ensaios *in*

*vitro* foram utilizados para avaliar a viabilidade celular, a atividade da fosfatase alcalina e a capacidade de mineralização extracelular das amostras preparadas. Este estudo oferece informações cruciais sobre os mecanismos de modificação da superfície induzida por SCS em substratos de Ti SLA e Ti NT. Essas informações podem ter implicações significativas no projeto e desenvolvimento de biomateriais com propriedades aprimoradas de bioatividade e osteointegração.

## **4.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

#### **4.2.1.1 SUPERFÍCIES SLA**

As amostras SLA utilizadas neste estudo foram fornecidos pela PECLAB LTDA (Belo Horizonte, Brasil, <https://www.peclab.com.br/>), fabricante de implantes dentários. Estas amostras foram um produto comercial constituído por discos de Ti jateados com alumina de alta pureza (> 99%) e tratados com mistura de ácido nítrico e ácido fluorídrico.

#### **4.2.1.2 SUPERFÍCIES NT**

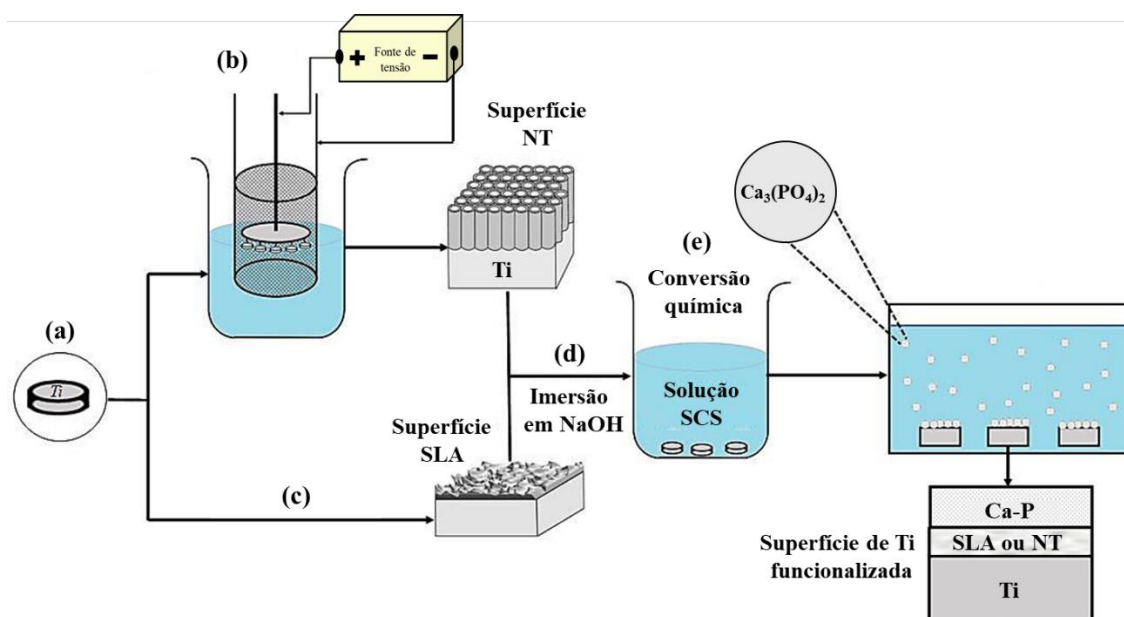
Amostras de Ti comercialmente puras (ASTM F67, ISO 5832-2) foram utilizadas neste estudo. Substratos circulares de 9,8 mm de diâmetro e 2,0 mm de espessura foram inicialmente usinados e cortados a partir de barras comerciais de Ti. A camada de óxido presente nos discos foi removida por polimento metalográfico. Esses discos foram posteriormente lavados com acetona e água destilada. Após a lavagem, as amostras foram secas em ar quente e, em seguida, imersas à temperatura ambiente em solução de ácido fluorídrico, ácido nítrico e água destilada. Os discos foram então enxaguados com água destilada e secos ao ar. Uma fonte de corrente contínua (CC) mantida em 25 V foi utilizada para o crescimento anódico dos nanotubos de TiO<sub>2</sub>. O processo de anodização foi conduzido por 90 min em uma célula eletroquímica de dois eletrodos, na qual um cesto de aço inoxidável

atuou como cátodo. Uma solução de ácido fosfórico e ácido fluorídrico foi utilizada como eletrólito [17,18]. Após a anodização, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas ao ar.

#### 4.2.1.3 REVESTIMENTOS CaP

Para aumentar a molhabilidade e a hidrofiliabilidade das amostras de SLA e NT, elas foram embebidas em solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M a 60 °C por 60 min. Esse tratamento é comumente utilizado para melhorar a bioatividade e as propriedades de adesão celular de biomateriais à base de titânio, aumentando a disponibilidade de grupos funcionais na superfície e favorecendo a formação de compostos CaP, essenciais para a integração do tecido ósseo [25]. Em seguida, os discos foram secos ao ar e armazenados em um dessecador de vidro sob vácuo. A SCS foi preparada conforme recomendado por Li *et al.* [26], utilizando água deionizada, cloreto de cálcio, fosfato de amônio e carbonato de sódio como reagentes. Os substratos de Ti foram imersos nessa solução a 37 °C por 12 h e 24 h. Em seguida, foram enxaguados com água deionizada e secos ao ar. A Figura 13 apresenta um resumo do trabalho experimental realizado neste estudo.

**Figura 13:** Representação esquemática do trabalho experimental realizado neste estudo. (a) amostras de Ti; (b) superfície NT obtida por anodização; (c) Superfície SLA fornecida pelo fabricante; (d) etapa de imersão em NaOH; (e) imersão das amostras em solução supersaturada de cálcio (SCS).



### 4.3 CARACTERIZAÇÕES

A microdureza das superfícies SLA e NT foi medida usando um microdurômetro Vickers (FM-700, Future-Tech Corp.). Trinta indentações foram feitas em cada superfície usando uma carga de 50 gf. A medida de AFM foi realizada no modo semi-contato no microscópio NTEGRA Aura (NT-MDT Co.). Para a avaliação da rugosidade, a rugosidade média (Ra) foi determinada a partir de 20 perfis horizontais e 20 perfis verticais gerados a partir de imagens de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ . Para a análise dos dados, foi utilizado o software Gwyddion (<http://gwyddion.net/>). O ângulo de contato de gotas sésseis de água de  $4 \mu\text{L}$  foi medido usando o software Image J (<https://imagej.nih.gov/>) e o método de aproximação de esfera ou elipse. Os ensaios de microscopia eletrônica foram realizados em microscópio FEG 3D da FEI Quanta, com distância de trabalho de 10,2 mm, tensão de aceleração de 15 kV e corrente de 1,1 nA. As amostras utilizadas nestes ensaios foram depositadas sobre substratos de alumínio utilizando uma fita de carbono dupla face. As análises de EDS foram realizadas usando um detector Bruker 5010 acoplado ao microscópio eletrônico. A GIXD foi realizado em um difratômetro de raios X Rigaku Ultima IV, operando a 40 kV e 30 mA. Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) foi empregado como fonte de radiação de raios X. Esses testes foram realizados com um tamanho de passo de  $0,01^\circ$  e um ângulo de incidência de  $0,5^\circ$ . Os espectros de XPS foram adquiridos com um ângulo de incidência normal, utilizando um sistema SPECS equipado com um analisador Phoibos-150 e uma fonte monocromática de raios X Al-K $\alpha$ .

(1486,6 eV). A pressão de base na câmara de ultra-alto vácuo foi mantida em cerca de  $10^{-10}$  mbar. O deslocamento de carga foi corrigido usando o pico de C 1s em 284,6 eV para carbono adventício. O FTIR foi realizado em espectrômetro Alpha Bruker usando um acessório de reflexão total atenuada e um cristal de diamante como elemento refletor. Os espectros foram registrados com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 128 varreduras.

## **4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS**

### **4.4.1 CULTURA CELULAR**

Para este estudo, a linhagem celular MC3T3-E1 subclone 14, um pré-osteoblasto imortalizado do crânio de camundongos neonatais (American Type Culture Collection, Arlington, VA), foi cultivada em meio essencial mínimo alfa ( $\alpha$ -MEM) (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco™), estreptomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e penicilina (500 U/mL) (Invitrogen™). O meio de cultura foi trocado a cada 48 h até atingir a confluência ideal de células. As células foram então destacadas com 1 mL de solução de tripsina (0,25%) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Gibco™) por 6 min a 37 °C, suspensas em 4 mL de meio fresco e transferidas para novos frascos na proporção desejada (por exemplo, 1:5). Como os osteoblastos apresentam reduzida formação de matriz mineralizada em passagens contínuas, os ensaios foram realizados na passagem 19. Para a realização dos ensaios *in vitro*, as amostras de cada grupo foram colocadas em triplicata em uma placa de 48 poços para todas as avaliações pretendidas e as células MC3T3-E1 foram semeadas a uma densidade de  $1,5 \times 10^4$  por poço. Após o plaqueamento, foram incubadas a 37 °C em estufa controlada por atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Para controle, todos os procedimentos para cada ensaio *in vitro* foram realizados em poços vazios. As amostras foram esterilizadas por irradiação gama na dose de 12 kGy utilizando uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (modelo IR-214, tipo GB-127, Nordion Inc., Canadá).

### **4.4.2 VIABILIDADE CELULAR**

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT) (Life Technologies) em 24, 48 e 72 h. Neste ensaio, 130  $\mu$ L de  $\alpha$ -MEM e 100  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) foram adicionados por poço após a remoção completa do meio de tratamento. Após 2 h de incubação a 37 °C, cristais de formazan foram observados por microscopia óptica e dissolvidos em 130  $\mu$ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em HCl 0,01 M (Sigma-Aldrich). Após 18 horas, o conteúdo dos poços foi homogeneizado, e 100  $\mu$ L de cada um foi adicionado, em triplicata, a placas de 96 poços. A densidade óptica foi medida usando um espectrômetro (Biotek, uQuant) no comprimento de onda de 595 nm. A viabilidade celular média nos grupos experimentais foi normalizada em relação à viabilidade média observada no grupo controle.

#### **4.4.3 DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

Células MC3T3-E1 foram cultivadas em  $\alpha$ -MEM suplementado com solução osteogênica (2,165 mg/mL de  $\beta$ -glicerol fosfato + ácido ascórbico) (Sigma-Aldrich) para induzir a diferenciação em uma linhagem osteogênica. As placas foram mantidas em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> e o meio de diferenciação osteogênica foi trocado a cada 2 dias.

#### **4.4.4 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA**

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi avaliada pelo ensaio de kit 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) - sal nitroazul tetrazólio (NBT) após 3, 7 e 14 dias de diferenciação. O meio de cultura foi descartado e as amostras foram lavadas com PBS 1 $\times$  estéril e descartadas nos dias selecionados para análise. As células foram então incubadas com 200  $\mu$ L/poço de uma solução de NBT/BCIP 1:1:8 em PBS por 2 h a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. A presença de precipitados azuis foi confirmada por microscopia óptica, e 210  $\mu$ L/poço de dodecil sulfato de sódio (SDS) HCl a 10% foi adicionado para suavizar as células sem remover a solução incubada de NBT/BCIP. As placas foram incubadas durante a noite para promover a solubilização dos precipitados. Após 18 h,

100  $\mu\text{L}$  de cada poço foram transferidos em triplicata para uma placa de 96 poços e a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro (Biotek, uQuant) a 595 nm.

#### **4.4.5 ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO**

A mineralização da matriz extracelular foi avaliada pela coloração de vermelho de alizarina após 10, 14 e 21 dias de diferenciação. Ao final de cada período, o meio dos poços foi descartado e as células lavadas com PBS 1 $\times$  estéril, pH 7,4. As células foram então fixadas em etanol absoluto a 70% por 1 h em refrigerador. Após a remoção da solução de etanol, os poços foram lavados com água destilada, que foi descartada, e então 200  $\mu\text{L}$  de solução corante de vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich®) na concentração de 40 mmol/L (pH 4,2) foram adicionados e agitados por 20 min. O corante foi removido e os poços foram lavados novamente com água destilada até que o sobrenadante estivesse limpo. 200  $\mu\text{L}$  de cloreto de cetilpiridínio a 10% foram então adicionados aos poços e agitados por 30 min. Após esse tempo, 100  $\mu\text{L}$  de cada poço foram transferidos em triplicata para uma nova placa de cultura de fundo plano de 96 poços e a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro (Biotek, uQuant) a 550 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem da área mineralizada em relação à área total analisada.

#### **4.4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística dos ensaios biológicos foi realizada por ANOVA one-way seguida do teste de Tukey utilizando o software GraphPad 8.0. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ao nível de significância de 5%.

### **4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

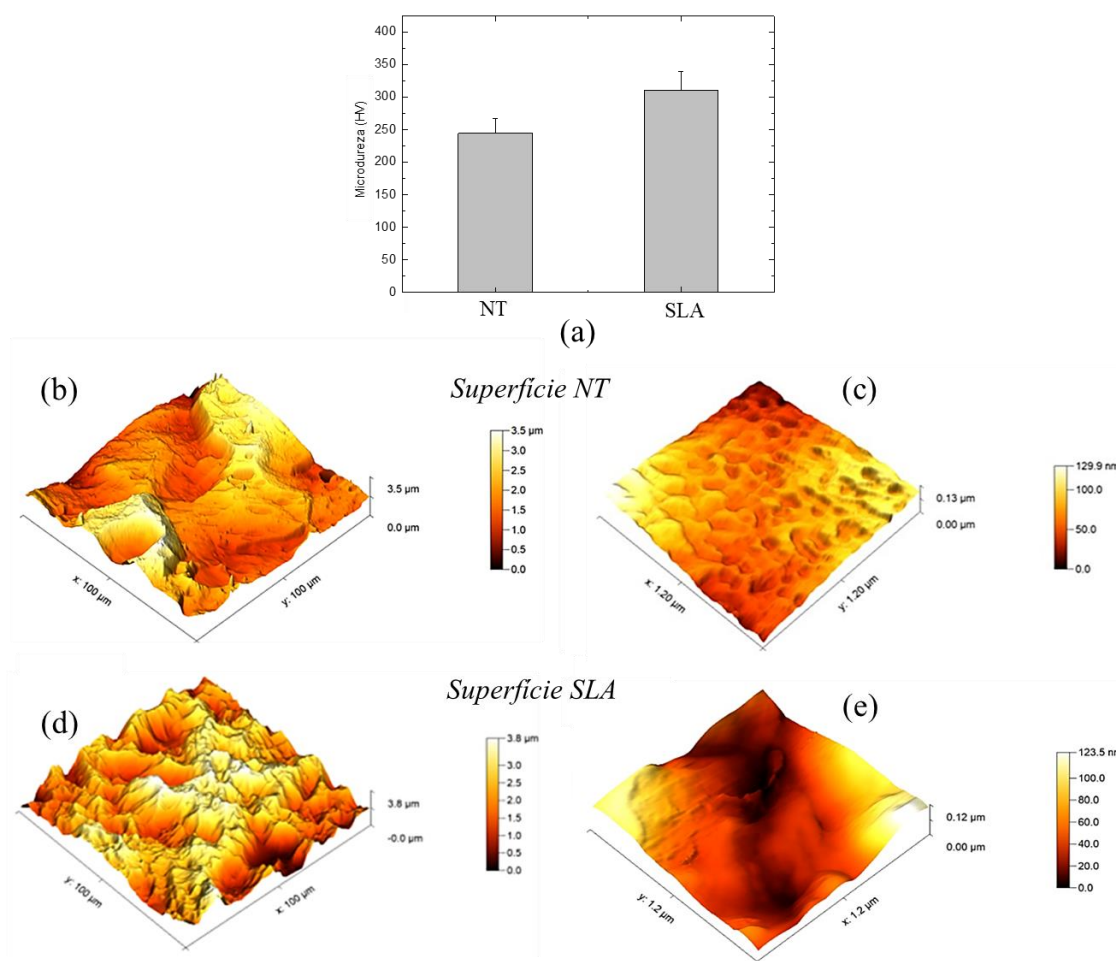


A Figura 14a apresenta os valores médios de microdureza medidos neste estudo. A dureza está diretamente associada à resistência ao desgaste e à abrasão do Ti, o que é crucial para a durabilidade dos implantes a longo prazo [27]. Os valores de microdureza encontrados para as amostras SLA foram superiores aos das superfícies NT, medindo  $311,5 \pm 28,5$  HV (dureza de Vicker) em comparação com  $244,9 \pm 22,2$  HV. Este resultado é consistente com estudos anteriores que atribuíram a alta dureza das superfícies SLA às mudanças estruturais induzidas pelo processo de jateamento. No processo SLA, partículas de areia são projetadas sobre a superfície do Ti, aumentando sua rugosidade e induzindo deformação plástica local e tensão residual compressiva no material [28]. Esta alta rugosidade desempenha um papel crítico no aumento da microdureza, aumentando a área de superfície e fornecendo múltiplos pontos de contato entre o penetrador e o material durante o teste de dureza. Como resultado, o material apresenta maior dureza devido a essas características superficiais. Além disso, as tensões residuais compressivas geradas atuam como mecanismo de reforço, inibindo a formação e propagação de fissuras e deslocamentos. Essa resistência inerente à deformação contribui ainda mais para o aumento observado na microdureza. Finalmente, o jateamento pode induzir o endurecimento à medida que os deslocamentos se acumulam no material. Esse fenômeno fortalece ainda mais o material, tornando-o mais resistente a deformações posteriores [29]. A presença de porosidade na camada de nanotubos tipicamente reduz a dureza das amostras NT devido à sua estrutura porosa [30]. Além disso, a natureza iônica da camada de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  com menor densidade desempenha um papel nas propriedades mecânicas das superfícies NT, alterando o processo de fratura e tornando-as parcialmente frágeis. As medidas de microdureza para ambas as amostras de NT e SLA apresentaram desvios padrão relativamente elevados devido a irregularidades na superfície e heterogeneidades nas amostras, como também observado por Lim *et al.* [31].

As Figuras 14b e 14d exibem imagens AFM ( $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ) de superfícies NT e SLA. Uma comparação das morfologias da superfície revela que as irregularidades são mais pronunciadas na amostra SLA. A rugosidade  $R_a$  da superfície SLA foi significativamente maior ( $R_a = 561,7 \pm 69,0$  nm) em relação à superfície NT ( $R_a = 317,1 \pm 42,7$  nm). Está claro que os tratamentos de condicionamento ácido e jateamento afetaram significativamente a morfologia da superfície do SLA, resultando em superfícies rugosas. Imagens AFM de semi-contato de área reduzida ( $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}^2$ )

também foram obtidas, como mostram as Figuras 14c e 14e. Essas imagens revelam que a superfície SLA não apresenta características nanométricas, ao passo que a superfície do NT exhibe rugosidade nanométrica praticamente uniforme, promovendo a diferenciação, proliferação e mineralização de osteoblastos durante o processo de osseointegração [10–12].

**Figura 14:** (a) Comparação dos valores de microdureza para amostras NT e SLA. Imagens AFM mostrando a topografia da superfície de NT (b – c) e SLA (d – e).



A Figura 15a mostra fotografias de gotículas de água gotejadas sobre as superfícies SLA e NT. A medida do ângulo de contato com a água oferece uma avaliação direta da hidrofobicidade e da capacidade de molhamento das superfícies tratadas. Isso é um fator crítico na osseointegração, pois pode influenciar a interação entre a superfície, fluidos biológicos, proteínas e células [17,18]. Dessa forma, a compreensão do comportamento

hidrofílico das superfícies fornece informações valiosas sobre sua eficácia na promoção da integração do implante com os tecidos circundantes e na sua resposta biológica. Esses fatores são essenciais para garantir a estabilidade e a funcionalidade do implante. De acordo com a equação de Young, o ângulo de contato intrínseco ( $\theta_y$ ) é dado pela equação (1):

$$\cos \theta_y = \frac{\sigma_{sv} - \sigma_{sl}}{\sigma_{lv}} \quad (1)$$

onde  $\gamma_{sv}$ ,  $\gamma_{sl}$ ,  $\gamma_{lv}$  são as tensões superficiais das interfaces sólido-vapor, sólido-líquido e líquido-vapor, respectivamente. Uma superfície é considerada hidrofílica se  $\theta_y$  for menor que  $90^\circ$ , enquanto um ângulo de contato maior que  $90^\circ$  é indicativo de uma superfície hidrofóbica. A natureza química e a rugosidade de uma superfície são fatores-chave que afetam sua molhabilidade. Segundo Wenzel, esses fatores podem amplificar os efeitos da hidrofilicidade ou hidrofobicidade causada pela composição química da superfície. Enquanto a equação de Young considera superfícies sólidas ideais, homogêneas, lisas e planas, a equação de Wenzel explica a infiltração de líquido em sulcos. Além disso, este último considera a diferença entre o ângulo de contato medido ( $\theta_m$ ) e o ângulo de contato de Young ( $\theta_y$ ), onde ( $r$ ) é o fator rugosidade conforme descrito na Equação (2) [32]:

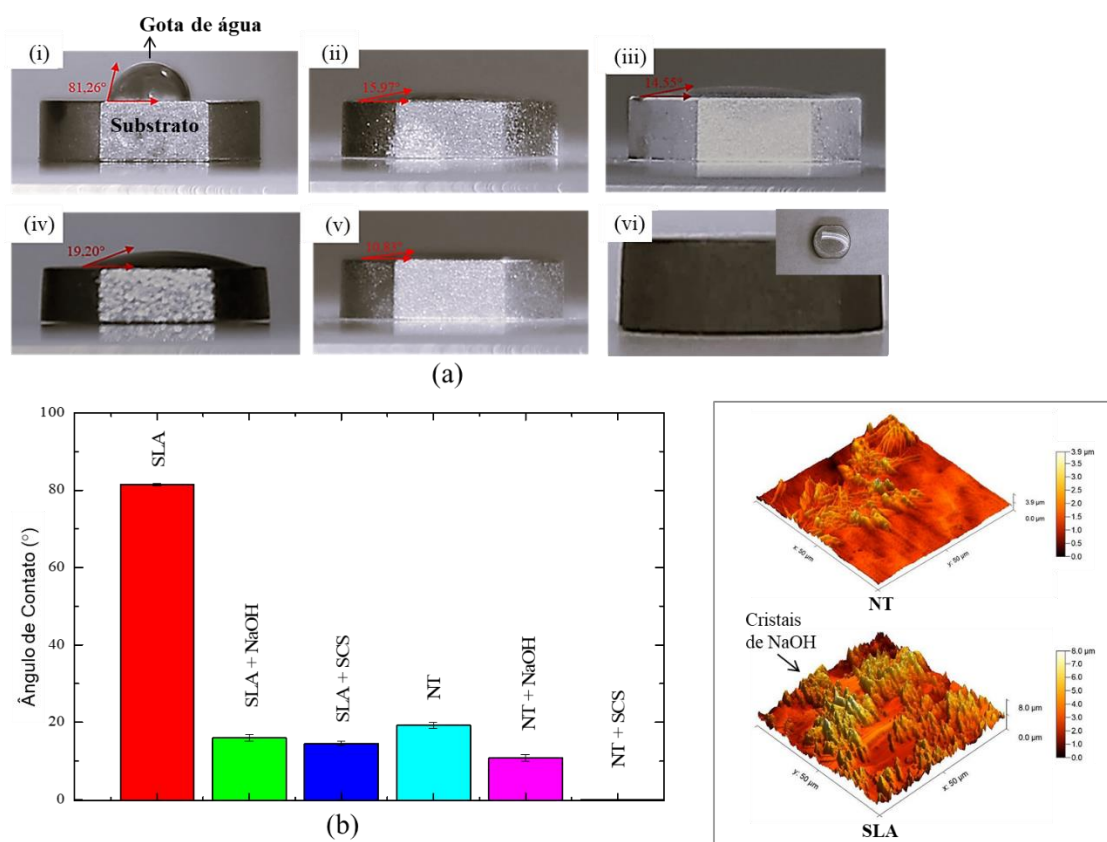
$$\cos \theta_m = r \cdot \cos \theta_y \quad (2)$$

Os ângulos de contato médios avaliados para amostras preparadas em diferentes condições são mostrados na Figura 15b. Esses testes foram realizados com amostras antes e após a imersão em soluções de NaOH e SCS. O comportamento hidrofílico da amostra SLA foi melhorado após a imersão em NaOH, evidenciado por uma redução significativa no ângulo de contato com a água de cerca de  $81^\circ$  para  $16^\circ$ . De fato, uma comparação das fotografias (Figuras 15a-i e 15a-ii) tiradas para amostras de SLA não tratadas e tratadas com NaOH revelou um aumento significativo na molhabilidade. Este resultado revela que o tratamento alcalino não só aumenta a rugosidade superficial como também altera suas propriedades químicas, resultando em uma melhora significativa na hidrofilicidade. A inserção da Figura 15 mostra imagens AFM das superfícies de SLA e NT após tratamento alcalino. Cristais de NaOH são observados nesses materiais, o que pode explicar o aumento observado na molhabilidade. A

presença desses cristais também fez com que a rugosidade superficial ( $R_a$ ) NT e SLA aumentasse de  $317,1 \pm 42,7$  nm e  $561,7 \pm 69,0$  nm para  $351,1 \pm 60,3$  nm e  $821,7 \pm 131,0$  nm, respectivamente. A conversão química das amostras em solução de SCS por 24 h apresentou comportamento semelhante, diminuindo o ângulo de contato para cerca de  $15^\circ$  (Figuras 15a-iii e 15b). O CaP é conhecido por seu comportamento hidrofílico e sua presença causou a diminuição do ângulo de contato com a água para a superfície SLA. Resultados semelhantes foram relatados por Wei *et al.* [33]. Nesse estudo, os autores empregaram um tratamento químico para modificar a superfície de um revestimento micro-arco oxidado (MAO) contendo Ca e P. Este revestimento MAO tratado quimicamente foi aquecido entre  $400^\circ\text{C}$  e  $800^\circ\text{C}$ . Os autores observaram a formação de um revestimento compósito amorfo hidrofílico à base de  $\text{TiO}_2$ , que facilitou o desenvolvimento de uma camada contínua de células MG63 na superfície do revestimento preparado, proporcionando um ambiente ótimo para a proliferação celular. A imersão das amostras NT em solução de NaOH resultou em uma diminuição no ângulo de contato com a água de  $19^\circ$  para  $11^\circ$ , confirmando o aumento da hidrofiliabilidade resultante do tratamento alcalino. Isso também fica evidente na comparação com amostras não tratadas (Figuras 15a-iv, 15a-v e 15b). Quando o CaP foi depositado por conversão química, o ângulo de contato diminuiu para cerca de  $0^\circ$  (Figuras 15a-vi e 15b), indicando que a superfície pode ser totalmente molhada pela água. Este é um achado importante, pois a molhabilidade superficial dos biomateriais determina a cascata biológica de eventos na interface biomaterial/hospedeiro [34]. A deposição de CaP na superfície do NT resulta em redução da rugosidade superficial devido ao bloqueio parcial dos nanotubos de  $\text{TiO}_2$ .

**Figura 15:** (a) Imagens mostrando a molhabilidade superficial de amostras submetidas a diferentes tratamentos: (i) SLA; (ii) imersão em NaOH; (iii) imersão em NaOH seguida de conversão química em SCS por 24 h; (iv) NT; (v) imersão em solução de NaOH; (vi) imersão em solução de NaOH e SCS por

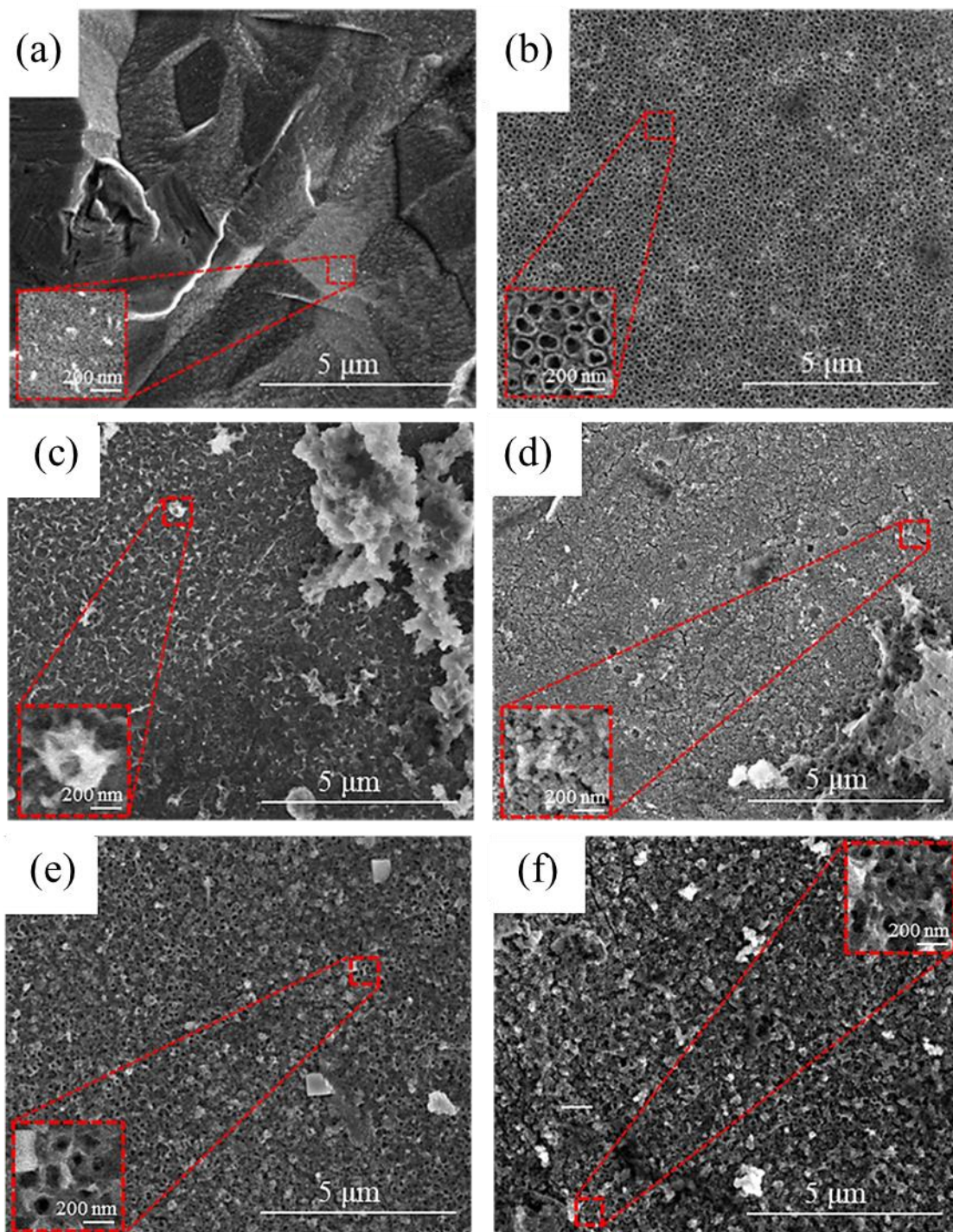
24 h. (b) Ângulos de contato com a água avaliados para essas amostras. Inserção: Imagens AFM de superfícies SLA e NT após tratamento alcalino com solução de NaOH.



As Figuras 16a e 16b mostram imagens MEV das superfícies de SLA e NT. Essas amostras exibem texturas diferentes; o SLA apresenta irregularidades, enquanto o NT é mais homogêneo. As morfologias detalhadas dos substratos são mostradas nas imagens ampliadas. Para o SLA, observa-se um óxido homogêneo, enquanto que para substratos NT são visíveis nanotubos de  $\text{TiO}_2$  com diâmetros em torno de 100 nm, como esperado para anodização realizada a 25 V [17,18]. Imagens MEV das superfícies SLA e NT após conversão química por 12 h e 24 h são apresentadas nas Figuras 16c a 16f. Independentemente do tempo de imersão no SCS, o CaP esteve presente em todas as amostras, indicando a modificação bem-sucedida tanto da SLA quanto da NT. A camada de CaP formada na superfície SLA pode ser vista em detalhes na Figura 16c. Ao examinar a superfície NT, vale ressaltar que, embora o revestimento de CaP cubra o topo dos nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , eles ainda são visíveis. As estruturas cúbicas observadas na Figura 16e são cristais de NaCl formados na solução de SCS.



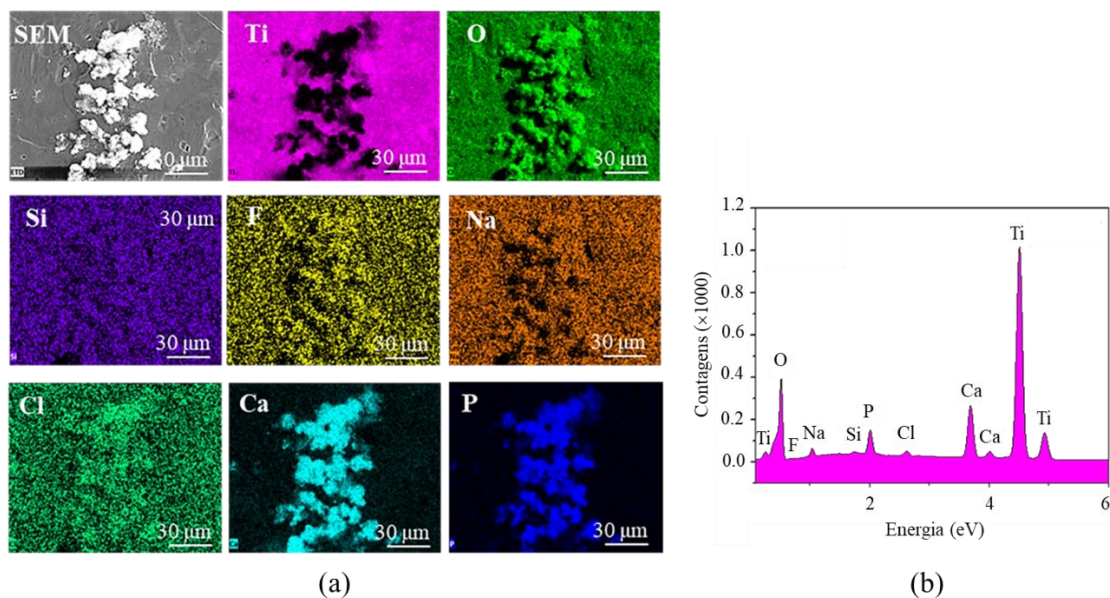
**Figura 16:** Imagens SEM de substratos SLA e NT antes (a – b) e após (c – f) imersão em SCS. As micrografias (a), (c) e (e) correspondem à superfície SLA, enquanto (b), (d) e (f) referem-se à amostra do NT.



A Figura 17a mostra o mapa químico elementar obtido para a amostra NT após conversão química. Esses mapas mostram que os revestimentos são constituídos de Ca, P e O, indicando a formação de um composto CaP. A Figura 17b mostra um espectro de

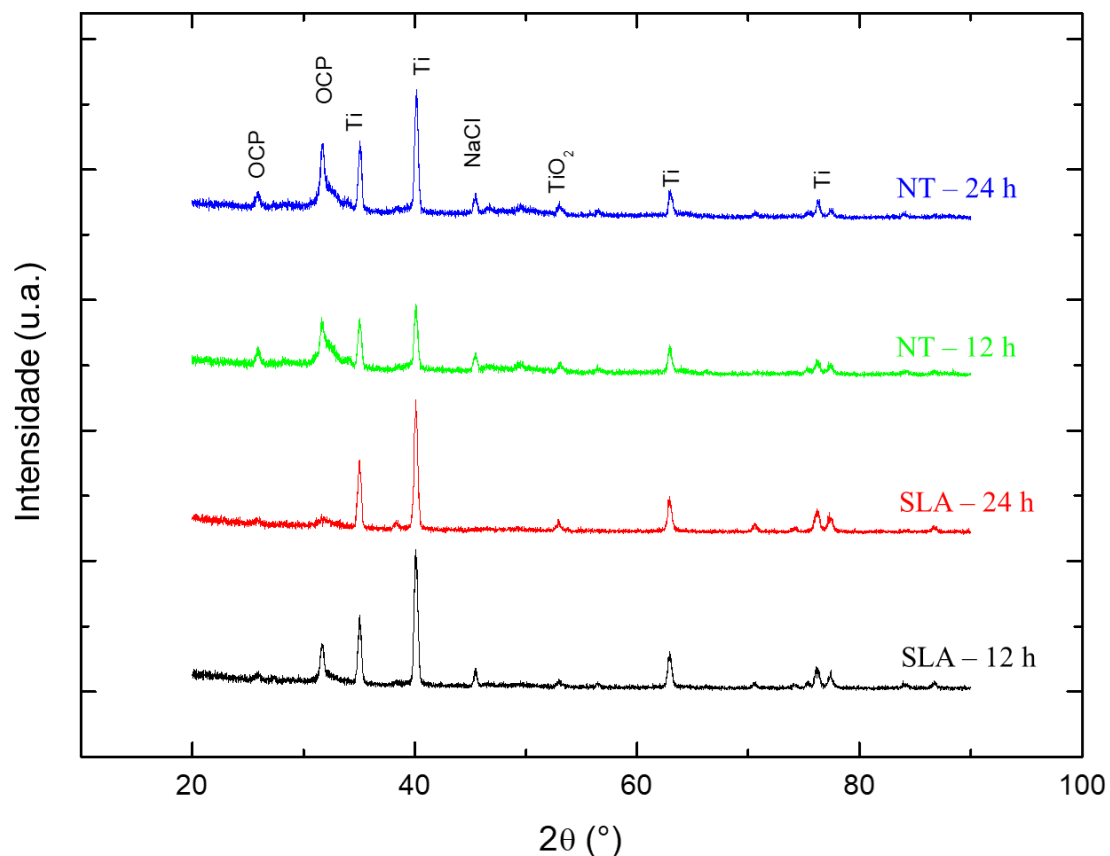
EDS coletado. As energias de raios X característicos dos elementos Ti, F, O, Na, Si, Cl, Ca e P foram identificadas como esperado. Si provém do processo de polimento realizado com lixas, enquanto F é derivado da solução de anodização. Além disso, Na e Cl são atribuídos à solução SCS.

**Figura 17:** (a) Mapeamento elemental de EDS e (b) espectro representativo de EDS da superfície NT imersa em solução SCS a 37 °C por 24 h.



A Figura 18 mostra os padrões de GIXRD obtidos para amostras de SLA e NT imersas em solução SCS por 12 h ou 24 h. Esses padrões mostram linhas de difração correspondentes a Ti,  $\text{TiO}_2$ , NaCl e fosfato octacálcico (OCP – um precursor da hidroxiapatita). As linhas associadas ao OCP são mais intensas para superfícies NT do que para as amostras SLA, sugerindo que as propriedades de superfície desempenham um papel crítico na promoção da deposição de fosfato. O tamanho dos cristalitos OCP foi determinado usando a equação de Scherrer. Os valores obtidos após 12 h de imersão foram 20 nm para a superfície SLA e 14 nm para a superfície NT. Após 24 h de imersão, os valores diminuíram para 8 nm para SLA e aumentaram para 18 nm para NT.

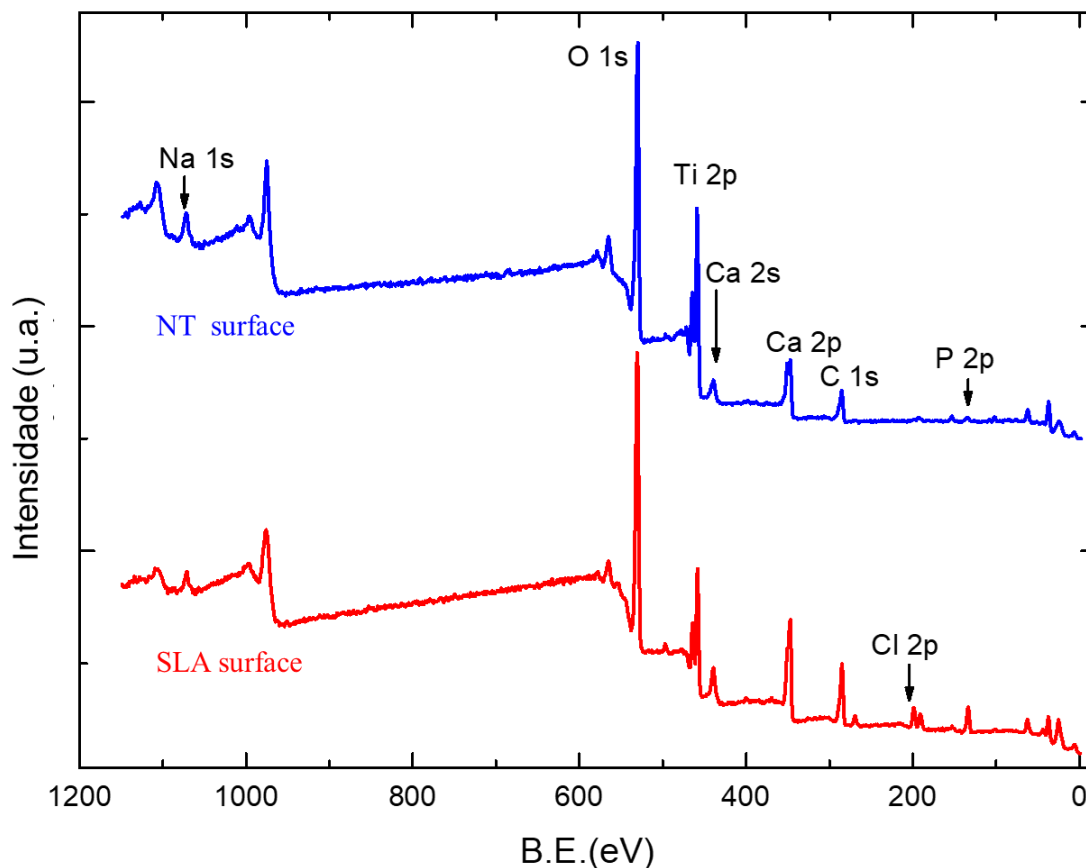
**Figura 18:** Padrões GIXRD de amostras NT e SLA imersas em solução SCS por 12 ou 24 horas.



A Figura 19 apresenta os espectros de XPS coletados das amostras imersas em SCS por 24 h. Em contraste com o GIXRD, os resultados do XPS fornecem informações sobre os nanômetros superiores dos substratos. Esses espectros mostram picos de Na 1s, O 1s, Ti 2p, Ca 2p, C 1s, Cl 2p e P 2p. A presença de Ca e P no Ti revela a deposição de um revestimento de CaP, com as maiores concentrações encontradas na superfície do NT, como mostra a Tabela 5. A relação Ca/P, que é comumente usada para estimar a fase fosfatada formada nas superfícies, também está listada na Tabela 5 [35–37]. Uma relação Ca/P em torno de 1,67 corresponde à formação de apatita nos ossos, enquanto uma relação entre 1,37 e 1,45 indica formação de OCP [35,36]. Uma relação Ca/P de 1,2-2,2 indica a formação de fosfato de cálcio amorfo, enquanto uma relação de 1 indica a formação de fosfato dicálcico diidratado [37]. Os resultados indicam a presença de diferentes fosfatos nas superfícies, como observado nas camadas superficiais examinadas pelo XPS. O OCP é indicado estar presente na amostra SLA após imersão em SCS por 24 h, enquanto CaP amorfo é observado nas amostras NT.

**Figura 19:** Espectros XPS de superfícies NT e SLA imersas em SCS por 24 h.





**Tabela 5:** Composição elementar obtida por XPS (em %).

Surface	Ca	P	Ti	O	C	Na	Cl	Ca/P
SCS-SLA	10.6	7.4	7.3	25.4	45.2	1.4	2.7	1.43
SCS-NT	15.4	12.2	7.6	51.7	11.6	1.5	-	1.26

A Tabela 6 exibe as energias de ligação dos picos observados no XPS após o ajuste de deslocamento, utilizando o pico do C 1s como referência. Os valores de Ca 2p<sub>3/2</sub> entre 347,0 e 347,4 eV e os valores de P 2p entre 133,1 e 132,9 eV confirmam a formação de fosfato de cálcio [38,39]. A presença de TiO<sub>2</sub> em todas as superfícies é indicada pelos valores de Ti 2p<sub>3/2</sub> em torno de 458,4 eV [39]. A compreensão do espectro de O 1s neste trabalho é complexa devido à sobreposição de picos, o que dificulta a distinção entre espécies de oxigênio associadas a óxidos, hidróxidos e compostos orgânicos [39]. Na 1s

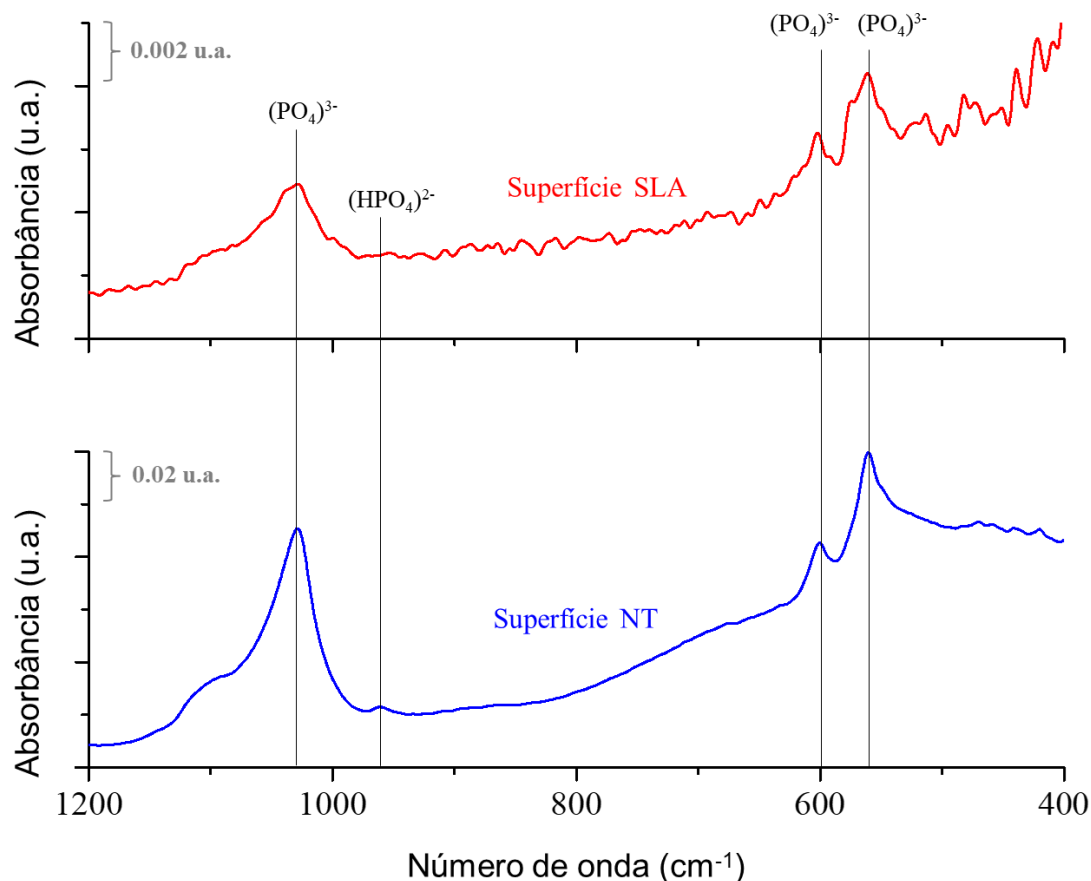
a 1071,6 eV sugere NaCl na superfície SLA imersa, os valores em torno de 1072,4 eV indicam o fosfato de sódio [40]. Cl 2p<sub>3/2</sub> também indica a presença de NaCl na amostra imersa SLA [40]. A presença de NaCl também é indicada pelo GIXRD (Figura 18).

**Tabela 6:** - Energia de ligação dos picos observados no XPS (em eV).

Surface	Ca 2p <sub>3/2</sub>	P 2p	Ti 2p <sub>3/2</sub>	O 1s	C 1s	Na 1s	Cl 2p <sub>3/2</sub>
SCS-SLA	347.3	133.1	458.3	530.9	284.6	1071.6	198.2
SCS-NT	347.4	133.0	458.3	530.1	284.6	1072.4	-

A Figura 20 mostra os espectros de FTIR obtidos para as superfícies SLA e NT após o tratamento de conversão química. As bandas de absorção em torno de 1020 cm<sup>-1</sup>, 600 cm<sup>-1</sup> e 560 cm<sup>-1</sup> são atribuídas a grupos PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> [41]. A banda em torno de 960 cm<sup>-1</sup> pode ser devida a grupos HPO<sub>2</sub><sup>4-</sup> [42]. Esses grupos são observados em compostos de CaP, indicando que a formação do revestimento foi bem-sucedida. Além disso, as bandas são mais evidentes nas superfícies NT em comparação com as superfícies SLA, sugerindo uma deposição mais eficaz do revestimento CaP nas primeiras. Esses resultados estão em concordância com os reportados anteriores.

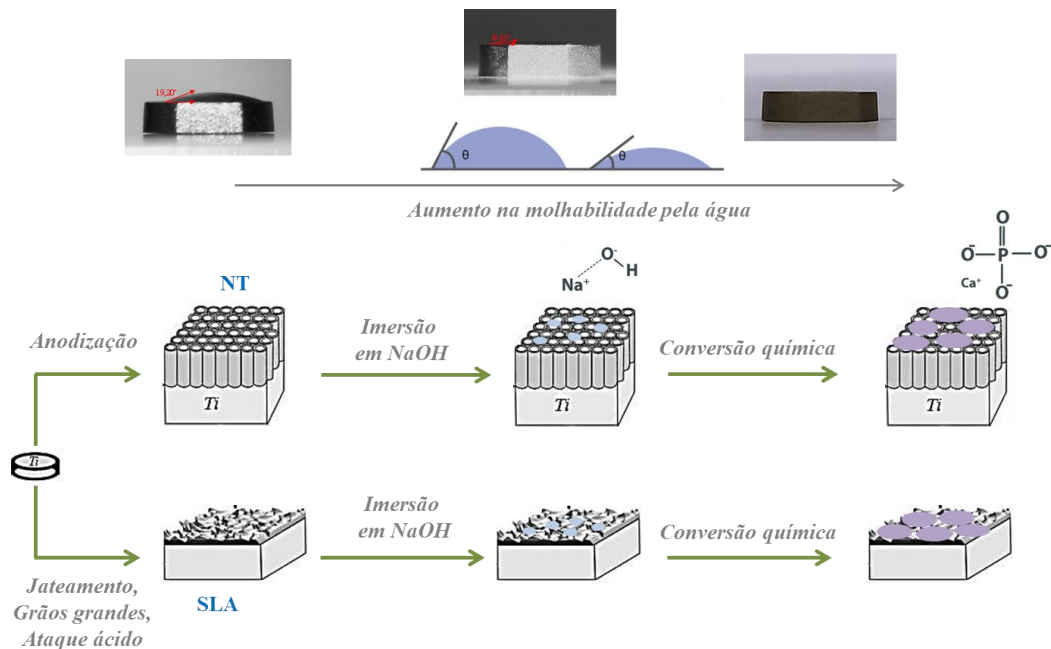
**Figura 20:** Espectros de FTIR de superfícies NT e SLA após 24 h de imersão em solução SCS.



De acordo com a análise GIXRD, a imersão em SCS tem o potencial de crescer OCPs na superfície do substrato. A concentração desses OCPs varia de acordo com o tempo de imersão e o tipo de superfície, sendo que esta última tem o impacto mais significativo. Como mostrado por AFM e MEV, a diferença na morfologia da superfície é importante, com as superfícies SLA e NT apresentando diferentes níveis de rugosidade. A presença de OCP na camada NT indica que esta superfície é mais propensa à deposição de fosfatos de cálcio cristalizados do que a amostra comercial de SLA. A lenta liberação de íons  $\text{OH}^-$  durante a imersão, provavelmente facilitada pela composição da solução e pela penetração prévia da solução de NaOH nos nanotubos de  $\text{TiO}_2$ , pode explicar sua contribuição para o processo de formação de hidroxiapatita. Tem sido relatado que as superfícies NT têm um efeito positivo sobre o comportamento biológico do Ti devido à sua rugosidade em nanoescala, melhor molhabilidade e osteogênese *in vivo* favorável [18,43]. Tais resultados são consistentes com os apresentados neste estudo, que fornece informações valiosas sobre a modificação da superfície do titânio e suas ligas. A Figura 21 mostra esquematicamente a evolução

observada para as superfícies de Ti testadas neste trabalho em função do tratamento aplicado.

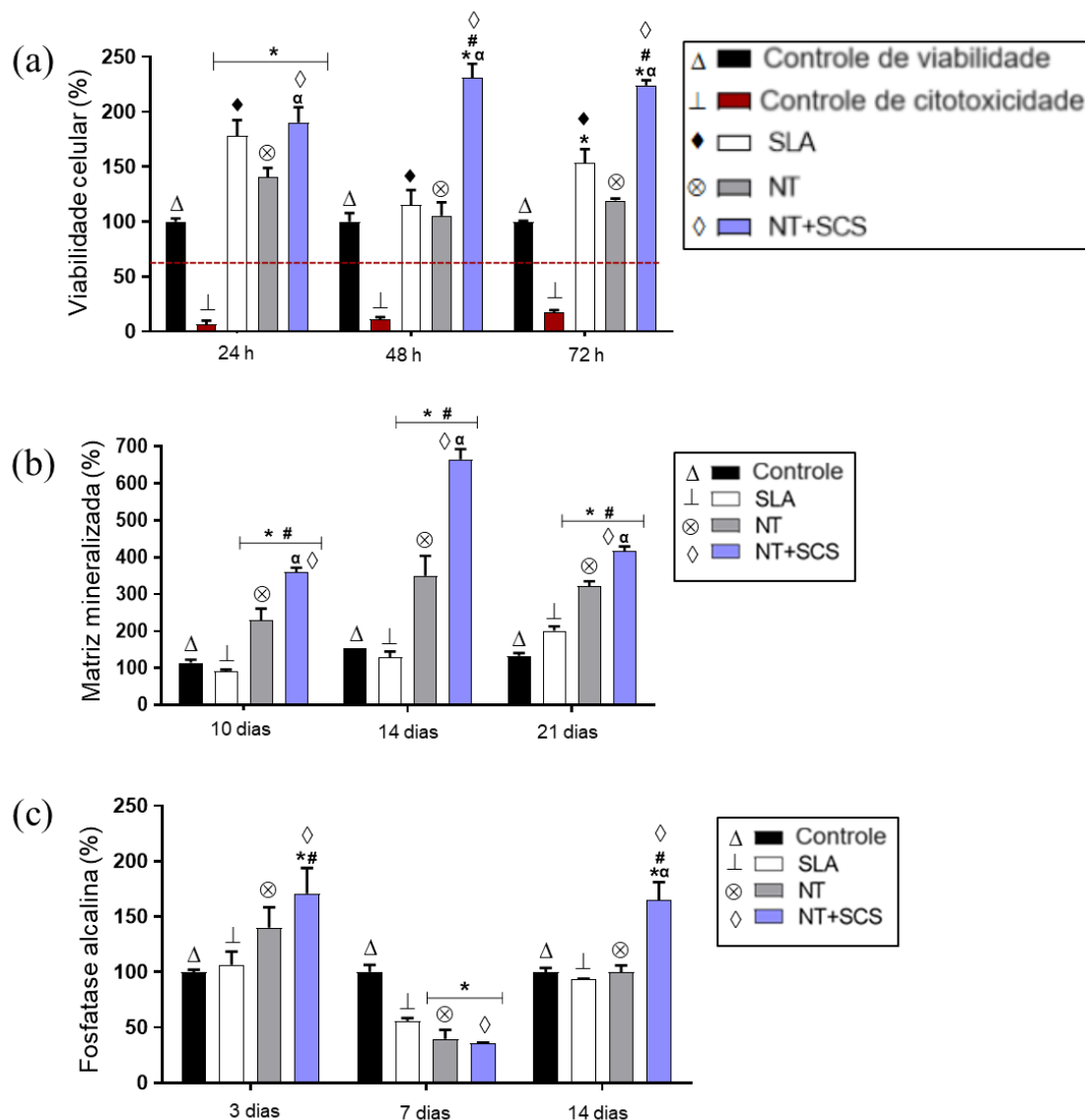
**Figura 21:** Evolução esquemática observada para superfícies de Ti testadas neste trabalho em função do tratamento aplicado.



A Figura 22a mostra a evolução da viabilidade das células MC3T3-E1 pré-osteoblásticas após 24, 48 e 72 h de cultura. Todas as superfícies apresentaram mais de 70% de viabilidade celular, indicando que são viáveis e atóxicas. Entretanto, a superfície NT modificada com CaP apresentou aumento progressivo e significativo da viabilidade celular ao longo do tempo, atingindo aproximadamente 200% após 72 h. Essa tendência sugere que a superfície NT modificada por CaP tem uma influência positiva na viabilidade celular. A Figura 22b mostra a mineralização da matriz extracelular no Ti após 10, 14 ou 21 dias de cultivo. A quantidade de matriz mineralizada em contato com essas superfícies aumentou entre 10 e 14 dias, sendo a superfície NT modificada com CaP a que apresentou maior aumento. Após 14 dias, a esse material apresentou um aumento de 6 vezes na matriz mineralizada (600%), o que é um nível notável de comportamento osteogênico em um período relativamente curto. A superfície NT também apresentou aumento significativo da matriz mineralizada aos 14 dias, com valor em torno de 350%. Em contraste, a superfície SLA não atingiu seu maior valor (cerca de 200%) até 21 dias, sugerindo que esse processo é mais lento para esta amostra. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) é demonstrada na Figura 22c. A ALP é um marcador precoce da diferenciação osteoblástica e um componente essencial

da mineralização óssea [44]. Os resultados mostram que as células em todas as superfícies de Ti induziram diferenciação no dia 3, mas a superfície NT modificada com CaP apresentou a maior atividade de ALP. Este resultado confirma que tal material apresenta maior resposta biológica, induzindo diferenciação osteoblástica precoce e rápida mineralização óssea. Em conclusão, os ensaios *in vitro* realizados neste estudo demonstram o uso promissor das amostras aqui desenvolvidas em aplicações biomédicas. As amostras exibiram alta viabilidade celular, atoxicidade e propriedades osteogênicas, com a superfície NT modificada com CaP apresentando o melhor desempenho. Isso destaca a eficácia da deposição de CaP na superfície NT.

**Figura 22:** (a) Ensaio MTT mostrando a viabilidade de células MC3T3-E1 após 24, 48 ou 72 horas. (b) Mineralização da matriz extracelular após 10, 14 e 21 dias de cultura. (c) Atividade da fosfatase alcalina (ALP) medida após 3, 7 ou 14 dias. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle; # $p < 0,05$  vs. SLA;  $\alpha p < 0,05$  vs. NT.



O diferencial deste estudo está na comparação entre uma superfície comercial de Ti SLA e uma superfície NT de  $\text{TiO}_2$ , uma abordagem que raramente foi explorada na literatura. Notavelmente, a superfície NT exibiu uma deposição significativamente maior de CaP, como evidenciado pela concentração pronunciada das espécies Ca, P e fosfato sobre ela. Essa melhora tanto na topografia da superfície quanto na composição química após a modificação do CaP torna a superfície NT particularmente promissora para potenciais aplicações de implantes em vários cenários clínicos. No entanto, a camada NT apresenta menores valores de microdureza, o que pode afetar a estabilidade dos implantes dentários ou qualquer aplicação em que a resistência à abrasão seja importante. A importância do comprometimento da reatividade superficial para melhorar os processos de funcionalização, a morfologia da superfície para a fixação celular e as propriedades mecânicas das superfícies NT e SLA são destacados neste estudo. Este trabalho também abre novas oportunidades para exploração adicional e potenciais avanços na tecnologia de implantes e biomateriais.

#### **4.6 CONCLUSÕES**

Neste estudo, duas superfícies de titânio, a saber, SLA e NT, foram investigadas. Os valores de microdureza das amostras de SLA foram superiores aos das superfícies NT. Este resultado é consistente com relatos anteriores que atribuem a alta dureza das superfícies SLA às mudanças estruturais induzidas pelo jateamento. Por outro lado, a presença de porosidade na superfície NT tipicamente reduz sua dureza. A rugosidade  $R_a$  da superfície SLA foi significativamente maior do que a da superfície NT. O comportamento hidrofílico da amostra SLA foi melhorado após a imersão em NaOH, evidenciado por uma redução significativa no ângulo de contato com a água. A conversão química desta amostra em SCS durante 24 h reduziu ainda mais o ângulo de contato para cerca de  $15^\circ$ . A imersão das amostras de NT em solução de NaOH resultou em diminuição do ângulo de contato com a água, confirmando o aumento da hidrofiliabilidade resultante do tratamento alcalino. Este ângulo de contato tornou-se desprezível quando o CaP foi depositado por conversão química, indicando que esta superfície é altamente hidrofílica. A deposição de CaP na superfície do NT resulta em redução da rugosidade superficial devido ao bloqueio parcial dos nanotubos de  $\text{TiO}_2$ . A quantidade de CaP depositada na superfície do NT foi maior, evidenciada pela alta

concentração dos grupos funcionais Ca, P e fosfato sobre ela. A topografia da superfície e a composição química da superfície NT modificada com CaP podem ser vantajosas para seu uso como implante em aplicações clínicas. Ensaios *in vitro* mostraram que a modificação química das superfícies NT com CaP resultou em amostras viáveis e atóxicas que mineralizaram rapidamente. Isso sugere que a deposição de CaP na superfície NT por conversão química é uma abordagem eficaz para aumentar a bioatividade dessas superfícies.

#### 4.7 REFERÊNCIAS

- [1] M. Khodaei, S. Hossein Kelishadi, The effect of different oxidizing ions on hydrogen peroxide treatment of titanium dental implant, *Surf. Coatings Technol.* 353 (2018) 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.08.037>.
- [2] D. V. Portan, A.A. Kroustalli, D.D. Deligianni, G.C. Papanicolaou, On the biocompatibility between TiO<sub>2</sub> nanotubes layer and human osteoblasts, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 100 A (2012) 2546–2553. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34188>.
- [3] A.N. Gravina, A.A. Rubert, M. Bertuola, M. Fernández Lorenzo de Mele, Bioactivity enhancement of cerium-containing titanium oxide nanotubes. Relationship between surface reactivity and nanostructuring process, *Surf. Coatings Technol.* 378 (2019) 124968. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.124968>.
- [4] D. Buser, N. Broggini, M. Wieland, R.K. Schenk, A.J. Denzer, D.L. Cochran, B. Hoffmann, A. Lussi, S.G. Steinemann, Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface, *J. Dent. Res.* 83 (2004) 529–533. <https://doi.org/10.1177/154405910408300704>.
- [5] F. Wang, C. Li, S. Zhang, H. Liu, Tantalum coated on titanium dioxide nanotubes by plasma spraying enhances cytocompatibility for dental implants, *Surf. Coatings Technol.* 382 (2019) 125161. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.125161>.
- [6] A. Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, *Clin. Oral Implants Res.* 20 (2009) 172–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x>.
- [7] H. Jiang, T. Zhang, W. Zhou, Z. Lin, Z. Liu, Effect of plasma oxidation –Treated TiO<sub>x</sub> film on early osseointegration, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 33 (2018) 1011–1018. <https://doi.org/10.11607/jomi.6680>.
- [8] Y. Li, W. Wang, H. Liu, J. Lei, J. Zhang, H. Zhou, M. Qi, Formation and in vitro/in vivo performance of “cortex-like” micro/nano-structured TiO<sub>2</sub> coatings on titanium by micro-arc oxidation, *Mater. Sci. Eng. C.* 87 (2018) 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.02.023>.
- [9] M. Tak, H. Tomar, R.G. Mote, Synthesis of titanium nanotubes (TNT) and its influence on electrochemical micromachining of titanium, *Procedia CIRP.* 95 (2020) 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2020.01.140>.
- [10] P. Mu, Y. Li, Y. Zhang, Y. Yang, R. Hu, X. Zhao, A. Huang, R. Zhang, X. Liu, Q. Huang, C. Lin, High-throughput screening of rat mesenchymal stem cell behavior on gradient TiO<sub>2</sub> nanotubes, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 2804–2814. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00488>.
- [11] W.Q. Yu, X.Q. Jiang, F.Q. Zhang, L. Xu, The effect of anatase TiO<sub>2</sub> nanotube layers on MC3T3-E1 preosteoblast adhesion, proliferation, and differentiation, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 94 (2010) 1012–1022. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32687>.



- [12] K. Von Der Mark, S. Bauer, J. Park, P. Schmuki, Another look at “Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 2130–2135. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903663106>.
- [13] L. Peng, A.D. Mendelsohn, T.J. LaTempa, S. Yoriya, C.A. Grimes, T.A. Desai, Long-Term small molecule and protein elution from TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Nano Lett.* 9 (2009) 1932–1936. <https://doi.org/10.1021/nl9001052>.
- [14] K.C. Popat, M. Eltgroth, T.J. LaTempa, C.A. Grimes, T.A. Desai, Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes, *Biomaterials.* 28 (2007) 4880–4888. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.037>.
- [15] K. Vasilev, Z. Poh, K. Kant, J. Chan, A. Michelmore, D. Losic, Tailoring the surface functionalities of titania nanotube arrays, *Biomaterials.* 31 (2010) 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.074>.
- [16] S. Minagar, C.C. Berndt, J. Wang, E. Ivanova, C. Wen, A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces, *Acta Biomater.* 8 (2012) 2875–2888. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.005>.
- [17] E. Marchezini, F.P. Oliveira, R. Lopes, T. Almeida, P.L. Gastelois, M.D. Martins, Controlling morphological parameters of a nanotubular TiO<sub>2</sub> coating layer prepared by anodic oxidation, *Mater. Res. Express.* 7 (2020) 25017. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6f35>.
- [18] E. Marchezini, T.C.S. de Almeida, F. de P. Oliveira, J.D.S. Albergaria, S. Ghosh, M.A.B. Tavares, R.R. Leite, G.A.B. Silva, M.D. Martins, Comparative study of nanostructured TiO<sub>2</sub> and SLA surface modifications for titanium implants: Surface morphology and in vitro evaluation, *Mater. Res.* 25 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2021-0613>.
- [19] S. Szmukler-Moncler, D. Perrin, V. Ahossi, G. Magnin, J.P. Bernard, Biological properties of acid etched titanium implants: Effect of sandblasting on bone anchorage, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 68B (2004) 149–159. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.20003>.
- [20] L. Chambrone, J.A. Shibli, C.E. Mercúrio, B. Cardoso, P.M. Preshaw, Efficacy of standard (SLA) and modified sandblasted and acid-etched (SLActive) dental implants in promoting immediate and/or early occlusal loading protocols: A systematic review of prospective studies, *Clin. Oral Implants Res.* 26 (2015) 359–370. <https://doi.org/10.1111/clr.12347>.
- [21] T. Mokabber, L.Q. Lu, P. van Rijn, A.I. Vakis, Y.T. Pei, Crystal growth mechanism of calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition, *Surf. Coatings Technol.* 334 (2018) 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.12.011>.
- [22] E. Vidal, J. Buxadera-Palomero, C. Pierre, J.M. Manero, M.P. Ginebra, S. Cazalbou, C. Combes, E. Rupérez, D. Rodríguez, Single-step pulsed electrodeposition of calcium phosphate coatings on titanium for drug delivery, *Surf. Coatings Technol.* 358 (2019) 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.11.037>.

- [23] R.Z. LeGeros, Calcium phosphate-based osteoinductive materials, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4742–4753. <https://doi.org/10.1021/cr800427g>.
- [24] A.M.C. Barradas, H. Yuan, C.A. van Blitterswijk, P. Habibovic, Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms, *Eur. Cell. Mater.* 21 (2011) 407–429. <https://doi.org/10.22203/eCM.v021a31>.
- [25] K.S. Raja, M. Misra, K. Paramguru, Deposition of calcium phosphate coating on nanotubular anodized titanium, *Mater. Lett.* 59 (2005) 2137–2141. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.01.084>.
- [26] F. Li, Q.L. Feng, F.Z. Cui, H.D. Li, H. Schubert, A simple biomimetic method for calcium phosphate coating, *Surf. Coatings Technol.* 154 (2002) 88–93. [https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(01\)01710-8](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(01)01710-8).
- [27] M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze, Š. Perutkova, V. Kralj-Iglič, I. Milošev, P. Schmuki, A. Iglič, M. Mozetič, Titanium nanostructures for biomedical applications, *Nanotechnology.* 26 (2015) 62002. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/6/062002>.
- [28] E. Velasco-Ortega, I. Ortiz-García, A. Jiménez-Guerra, L. Monsalve-Guil, F. Muñoz-Guzón, R.A. Perez, F.J. Gil, Comparison between sandblasted acid-etched and oxidized titanium dental implants: In vivo study, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20133267>.
- [29] A. Fitzner, J. Palmer, B. Gardner, M. Thomas, M. Preuss, J.Q. da Fonseca, On the work hardening of titanium: new insights from nanoindentation, *J. Mater. Sci.* 54 (2019) 7961–7974. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03431-w>.
- [30] S. Durdu, G. Cihan, E. Yalcin, A. Altinkok, Characterization and mechanical properties of TiO<sub>2</sub> nanotubes formed on titanium by anodic oxidation, *Ceram. Int.* 47 (2021) 10972–10979. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.12.218>.
- [31] B.-S. Lim, H.-R. Cho, H.-C. Choe, Nanotube shape changes on Ti-6Al-4V alloy via various applied potential for bio-implants, *Appl. Nanosci.* 12 (2022) 3329–3336. <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02541-3>.
- [32] M. Surmeneva, P. Nikityuk, M. Hans, R. Surmenev, Deposition of ultrathin nano-hydroxyapatite films on laser micro-textured titanium surfaces to prepare a multiscale surface topography for improved surface wettability/energy, *Materials (Basel)*. 9 (2016) 862. <https://doi.org/10.3390/ma9110862>.
- [33] D. Wei, Y. Zhou, C. Yang, Structure, cell response and biomimetic apatite induction of gradient TiO<sub>2</sub>-based/nano-scale hydrophilic amorphous titanium oxide containing Ca composite coatings before and after crystallization, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 74 (2009) 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.07.025>.
- [34] F. Rupp, R.A. Gittens, L. Scheideler, A. Marmur, B.D. Boyan, Z. Schwartz, J. Geis-Gerstorfer, A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2894–2906. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.040>.
- [35] A. Thirugnanam, T.S. Sampath Kumar, U. Chakkingal, Tailoring the bioactivity

- of commercially pure titanium by grain refinement using groove pressing, *Mater. Sci. Eng. C*. 30 (2010) 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.002>.
- [36] M. Li, M. Wang, L. Wei, A. Werner, Y. Liu, Biomimetic calcium phosphate coating on medical grade stainless steel improves surface properties and serves as a drug carrier for orthodontic applications, *Dent. Mater.* 39 (2023) 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2022.12.009>.
- [37] A. Roguska, M. Pisarek, M. Andrzejczuk, M. Dolata, M. Lewandowska, M. Janik-Czachor, Characterization of a calcium phosphate–TiO<sub>2</sub> nanotube composite layer for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C*. 31 (2011) 906–914. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.02.009>.
- [38] T. FU, H. LI, J. SUN, G. LI, W. LI, H. ZHANG, Facile hydrothermal synthesis of TiO<sub>2</sub>-CaP nano-films on Ti6Al4V alloy, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*. 25 (2015) 1122–1127. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(15\)63706-2](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(15)63706-2).
- [39] R. V Chernozem, M.A. Surmeneva, B. Krause, T. Baumbach, V.P. Ignatov, A.I. Tyurin, K. Loza, M. Epple, R.A. Surmenev, Hybrid biocomposites based on titania nanotubes and a hydroxyapatite coating deposited by RF-magnetron sputtering: Surface topography, structure, and mechanical properties, *Appl. Surf. Sci.* 426 (2017) 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.199>.
- [40] J.F. Moulder, J. Chastain, R.C. King, *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy: A reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data*, Physical Electronics, Eden Prairie, 1995.
- [41] G.M.L. Dalmônico, D.F. Silva, P.F. Franczak, N.H.A. Camargo, M.A. Rodríguez, Elaboration biphasic calcium phosphate nanostructured powders, *Boletín La Soc. Española Cerámica y Vidr.* 54 (2015) 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2015.02.006>.
- [42] A. Roguska, M. Pisarek, M. Andrzejczuk, M. Lewandowska, K.J. Kurzydowski, M. Janik-Czachor, Surface characterization of Ca-P/Ag/TiO<sub>2</sub> nanotube composite layers on Ti intended for biomedical applications, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 100A (2012) 1954–1962. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34044>.
- [43] J. Huang, X. Zhang, W. Yan, Z. Chen, X. Shuai, A. Wang, Y. Wang, Nanotubular topography enhances the bioactivity of titanium implants, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 13 (2017) 1913–1923. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.017>.
- [44] W. Na, M.-K. Kang, S.-H. Park, D.Y. Kim, S.Y. Oh, M.-S. Oh, S. Park, I.-J. Kang, Y.-H. Kang, Aesculetin accelerates osteoblast differentiation and matrix-vesicle-mediated mineralization, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 12391. <https://doi.org/10.3390/ijms222212391>.

## 5. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE SUPERFÍCIES NANOTUBULARES DE Ti COM FOSFATO DE CÁLCIO E RANELATO DE ESTRÔNCIO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

O processo de anodização é capaz de criar uma superfície nanoestruturada (NT) sobre o Ti utilizado em implantes osseointegráveis. Essa modificação possui o potencial de aprimorar o processo de osseointegração. Neste trabalho foi realizada a modificação química da superfície NT pela incorporação de fosfato de cálcio (CaP) e ranelato de estrôncio (RSr) e uma conjugação desses compostos. Os resultados obtidos demonstraram sucesso nas deposições, sem que ocorresse o bloqueio total dos nanotubos. De acordo com os ensaios *in vitro*, todas as superfícies funcionalizadas demonstraram alta viabilidade celular. Além disso, as superfícies NT/CaP e NT/CaP+RSr aceleraram o processo de mineralização. Notavelmente, o tratamento com RSr na superfície NT mostrou-se eficaz na promoção da diferenciação osteogênica. Esses resultados destacam o elevado potencial das superfícies analisadas na área da implantodontia.

**Submetido para *Materials Chemistry and Physics* em outubro de 2023.**

### 5.1. INTRODUÇÃO

O titânio (Ti) e suas ligas são amplamente utilizados em implantes dentários devido à sua significativa resistência à corrosão, grande biocompatibilidade, baixa densidade, alto módulo de elasticidade e notável estabilidade química, biológica e mecânica [1-3]. À medida que a demanda por dispositivos odontológicos aumenta por razões reabilitadoras e estéticas, há uma necessidade de melhoria contínua nas superfícies de Ti [4-6]. Sabe-se que fatores topográficos e químicos desempenham um papel crítico no processo de osseointegração [7-10]. É relatado que o Ti tem alta inércia biológica, o que pode levar a uma osseointegração lenta e deficiente e ao afrouxamento do implante ao longo do tempo [11-12]. Como resultado, os implantes de Ti são frequentemente submetidos a tratamentos de superfície para aumentar sua rugosidade, aposição óssea e capacidade de osseointegração [13-14]. Dentre esses tratamentos superficiais, a oxidação anódica merece destaque. Esse processo produz nanotubos de  $\text{TiO}_2$  de

comprimentos e diâmetros personalizados, resultando em aumento da área de contato osso-implante, melhor ancoragem para osteoblastos, aumento da aposição óssea e melhor capacidade geral de osseointegração [15-17]. Superfícies nanotubulares (NT) também apresentam potencial significativo para funcionalização. Portanto, a deposição de vários compostos em superfícies NT tem sido bastante estudada [18-19]. Dentre essas opções, o fosfato de cálcio (CaP) tem emergido como um candidato promissor devido à sua capacidade de promover proliferação, diferenciação e deposição mineral de osteoblastos [20,21]. Em um estudo recente [22], mostramos que a incorporação de CaP em superfícies NT pode melhorar significativamente seu comportamento biológico, promovendo seu uso na engenharia de tecido ósseo. Os ensaios *in vitro* mostraram que tais superfícies são candidatas promissoras para uso biomédico, exibindo alta viabilidade celular, não-toxicidade e propriedades osteogênicas.

O ranelato de estrôncio (RSr) tem recebido grande atenção por seu papel no tratamento da osteoporose, particularmente em mulheres na pós-menopausa, resultando em aumento da densidade óssea e redução do risco de fratura [23-25]. O RSr é recomendado para pacientes com osteoporose grave que não responderam aos tratamentos convencionais para a osteoporose, desde que não apresentem contraindicações, tais como hipertensão não controlada, histórico confirmado ou atual de doença cardíaca isquêmica, doença arterial periférica e/ou doença cerebrovascular. Seu mecanismo de ação é estimular a formação de novos ossos, inibindo a reabsorção [26]. Isso ocorre promovendo a proliferação e diferenciação de células pré-osteoblásticas e reduzindo a atividade osteoclástica durante a remodelação óssea. Contudo, a administração oral do RSr tem sido associada a efeitos adversos, incluindo exantema medicamentoso com eosinofilia e, em alguns casos, hipomineralização óssea. [29]. Portanto, é imperativo avaliar os efeitos da administração local de RSr sobre implantes [29, 30].

Neste estudo, realizamos uma análise comparativa entre uma superfície NT de Ti antes e após a modificação com CaP e RSr. Esta é a primeira vez que tal abordagem é relatada na literatura, enfatizando a novidade e a importância deste estudo. As amostras preparadas foram examinadas por várias técnicas, incluindo microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), difusividade térmica, microscopia de força atômica (AFM), medidas de ângulo de contato com a água,

difração de raios X de incidência rasante (GIXRD) e espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS). Ensaio *in vitro* foram utilizados para avaliar a viabilidade celular, a atividade da fosfatase alcalina e o potencial de mineralização extracelular dos materiais preparados.

## **5.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

#### **5.2.1.1 SUBSTRATOS NT**

Substratos circulares de 9,8 mm de diâmetro e 2,0 mm de espessura foram cortados a partir de barras comerciais de Ti (ASTM F67, ISO 5832-2). Polimento metalográfico foi utilizado para remover a camada de óxido presente nessas amostras. Em seguida, foram enxaguados com acetona e água destilada. Após essa etapa de limpeza, os discos foram secos com ar quente e imersos à temperatura ambiente em solução de ácido fluorídrico, ácido nítrico e água destilada. Posteriormente, foram lavados com bastante água destilada e secos ao ar. Uma fonte de corrente contínua (CC) de 25 V foi usada para o crescimento anódico dos nanotubos de TiO<sub>2</sub>. O processo de anodização durou 90 min e foi conduzido em uma célula eletroquímica composta por dois eletrodos, tendo um cesto de aço inoxidável desempenhando o papel de cátodo. Uma solução contendo ácido fosfórico e ácido fluorídrico foi utilizada como eletrólito [15, 16]. Após a anodização, as amostras foram lavadas com água deionizada, secas ao ar e mantidas em dessecador sob vácuo.

#### **5.2.1.2 MODIFICAÇÃO COM CaP e RSr**

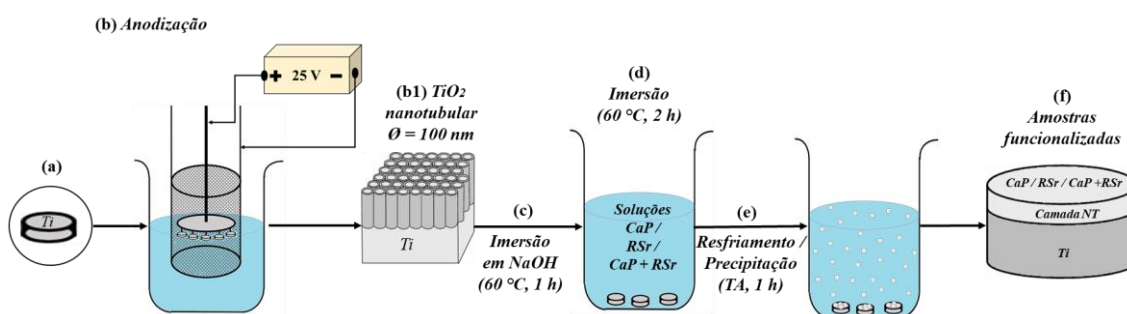
Para melhorar a molhabilidade e a hidrofiliabilidade das superfícies NT, elas foram primeiramente imersas em uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M a

60 °C por 60 min. Tem sido relatado que esta abordagem aumenta a concentração de grupos OH<sup>-</sup> hidrofílicos nas superfícies tratadas, ocasionando o aumento do pH na parte interna dos nanotubos, favorecendo a nucleação dos fosfatos de cálcio [31]. Após essa etapa, os substratos foram secos ao ar e armazenados em dessecador a vácuo. O CaP foi preparado a partir de água deionizada, nitrato de cálcio, fosfato de amônio e hidróxido de sódio, conforme recomendado em outro trabalho [32]. A concentração de CaP na solução preparada foi de 0,1 g.L<sup>-1</sup>, como sugerido por Guo *et al.* [33] O RSr foi adquirido de um fornecedor brasileiro (Araújo Manipulação) e posteriormente disperso em água com uma concentração de 0,256 g.L<sup>-1</sup>, conforme na literatura. [34]. As amostras NT de TiO<sub>2</sub> foram imersas por 2 h a 60 °C e 50 rpm em três diferentes soluções, conforme descrito na Tabela 7. Essas amostras foram então deixadas resfriar até a temperatura ambiente, secas ao ar e armazenadas em um dessecador. O trabalho experimental realizado neste estudo está resumido na Figura 23.

**Tabela 7:** Composição das soluções de CaP e RSr preparadas neste estudo.

Solução (1000 mL)	CaP/g	RSr/g
1	0,1	-
2	-	0,256
3	0,1	0,256

**Figura 23:** Esquema do trabalho experimental realizado neste estudo. (a) amostras de Ti; (b) oxidação anódica; (b1) superfície de nanotubos de TiO<sub>2</sub>; (c) imersão em solução de NaOH; (d-e) etapa de imersão; f) amostras modificadas à superfície.



### 5.3 CARACTERIZAÇÕES

A análise de AFM foi realizada no modo semi-contato em microscópio NTEGRA Aura (NT-MDT Co.). A análise dos dados foi realizada por meio do software Gwyddion. O ângulo de contato com gotículas sésses de 4  $\mu\text{L}$  de água foi medido pelo método de aproximação esférica ou elíptica usando o software Image J. A análise por MEV foi realizada em microscópio FEG 3D FEI Quanta em tensão de aceleração de 15 kV, corrente de 1,1 nA e distância de trabalho de 10,2 mm. As amostras foram montadas em porta-amostras de alumínio com fita de carbono dupla face. Um detector Bruker 5010 acoplado ao microscópio eletrônico foi utilizado para análise de EDS. O GIXRD foi realizado em difratômetro de raios X Rigaku Ultima IV, operando a 40 kV e 30 mA.  $\text{Cu-K}\alpha$  ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) foi empregada como fonte de radiação. Esses testes foram realizados com um tamanho de passo de  $0,01^\circ$  e um ângulo de incidência de  $0,5^\circ$ . Os espectros de XPS foram coletados no ângulo de decolagem normal usando um sistema SPECS equipado com um analisador Phoibos-150 e uma fonte monocromática de raios X  $\text{Al-K}\alpha$  (1486,6 eV). A pressão de base na câmara de ultra-alto vácuo foi mantida em cerca de  $10^{-10}$  mbar. O deslocamento de carga foi corrigido usando o pico de C 1s em 284,6 eV para o carbono adventício.

É bem reconhecido que o processo de osseointegração pode ser afetado adversamente pelo calor gerado pelo atrito durante a cirurgia de implante oral [35]. Além disso, o aquecimento excessivo na interface implante-osso pode resultar na retenção de calor dentro do tecido ósseo, potencialmente levando à necrose óssea [36]. Por esta razão, a investigação da transferência de calor em tais materiais é de grande importância. Neste estudo, avaliamos a difusividade térmica das amostras preparadas à temperatura ambiente utilizando o Método do Quadrupolo Térmico [37, 38]. Para tanto, utilizou-se um aparelho flash Protolab QuadruFlash 1200. Foram testadas amostras de 2 mm de espessura e 12 mm de diâmetro. O Guia ISO/BIPM para a Expressão da Incerteza na Medição (GUM) foi utilizado para estimar a incerteza associada a esses ensaios [39].



## 5.4 ENSAIOS *IN VITRO*

### 5.4.1 CULTURA CELULAR

A linhagem celular MC3T3-E1 subclone 14, que consiste em pré-osteoblastos imortalizados derivados do crânio de camundongos neonatais (American Type Culture Collection), foi utilizada neste estudo. Essas células foram cultivadas em meio essencial mínimo alfa ( $\alpha$ -MEM) (Gibco suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), estreptomicina ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e penicilina ( $500 \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Invitrogen). O meio de cultura foi renovado a cada 48 h até atingir uma confluência celular ótima. Em seguida, as células foram destacadas com solução de 1 mL de tripsina (0,25%) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Gibco™) por 6 min a  $37^\circ\text{C}$ , suspensas em 4 mL de meio fresco e transferidas para novos frascos na proporção desejada (por exemplo, 1:5). Para evitar a reduzida formação de matriz mineralizada observada nos osteoblastos nas passagens mais elevadas, os ensaios foram realizados na passagem 19. As amostras de cada grupo foram colocadas em triplicata em uma placa de 48 poços para experimentos *in vitro*. As células MC3T3-E1 foram semeadas a uma densidade de  $1,5 \times 10^4$  células por poço. Após o plaqueamento, as células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera controlada com 5% de  $\text{CO}_2$ . Como controle, todos os procedimentos para cada ensaio *in vitro* foram realizados em poços vazios. Antes do uso, as amostras foram esterilizadas com radiação gama utilizando uma dose de 12 kGy e uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (modelo IR-214, tipo GB-127, Nordion Inc.).

### 5.4.2 VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade celular foi avaliada pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Life Technologies) em três momentos distintos: 24, 48 e 72 h. Neste ensaio, 130  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -MEM e 100  $\mu\text{L}$  de solução de MTT ( $5 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram adicionados a cada poço após a remoção do meio de tratamento. Após incubação por 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ , cristais de formazan foram visualizados por microscopia óptica e,

em seguida, dissolvidos em 130  $\mu\text{L}$  de solução contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em HCl 0,01 M (Sigma-Aldrich). Após uma incubação adicional de 18 horas, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e 100  $\mu\text{L}$  de cada poço foram adicionados em triplicata a placas de 96 poços. A densidade óptica foi então medida em um comprimento de onda de 595 nm usando um espectrômetro (Biotek, uQuant). A viabilidade celular média nos grupos experimentais foi normalizada em relação à viabilidade média observada no grupo controle.

### **5.4.3 DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

Células MC3T3-E1 foram cultivadas em  $\alpha$ -MEM suplementado com uma solução osteogênica (consistindo de 2,165  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\beta$ -glicerol fosfato e ácido ascórbico) Sigma-Aldrich. Essa suplementação foi utilizada para promover a diferenciação das células em uma linhagem osteogênica. As placas de cultura foram mantidas em estufa de 5% de  $\text{CO}_2$  e o meio de diferenciação osteogênica foi renovado a cada 48 h.

### **5.4.4 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA**

A atividade da fosfatase alcalina (FA) foi avaliada usando o ensaio do kit 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) - sal nitroazul tetrazólio (NBT) em três momentos diferentes: 7, 14 e 21 dias após a diferenciação. Nos dias de análise designados, o meio de cultura foi aspirado e as amostras foram cuidadosamente lavadas com PBS 1 $\times$  estéril antes de prosseguir. As células foram então incubadas com 200  $\mu\text{L}$ /poço de uma solução de NBT/BCIP 1:1:8 em PBS por 2 h a 37  $^{\circ}\text{C}$  em um ambiente de 5% de  $\text{CO}_2$ . A presença de precipitados azuis foi confirmada por microscopia de luz. Para facilitar a suavização celular sem perturbar a solução incubada de NBT/BCIP, foram adicionados 210  $\mu\text{L}$  por poço de SDS a 10% em solução de HCl. As placas foram então incubadas durante a noite para facilitar a solubilização dos precipitados. Após 18 h, 100  $\mu\text{L}$  de cada poço foram transferidos em triplicata para uma placa de 96 poços e a densidade óptica foi medida a 595 nm usando um espectrofotômetro (Biotek, uQuant).

#### 5.4.5 ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO

A mineralização da matriz extracelular foi avaliada pela coloração de vermelho de alizarina após 10, 14 e 21 dias de diferenciação. Ao final de cada período, o meio de cultura foi aspirado dos poços e as células foram lavadas com PBS 1× estéril em pH 7,4. As células foram então fixadas em etanol absoluto a 70% por 1 h em refrigerador. Após a retirada da solução de etanol, os poços foram lavados com água destilada, descartando-se as lavagens a cada vez. Em seguida, 200 µL de solução de corante vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich) na concentração de 40 mmol. L<sup>-1</sup> (pH 4,2) foi adicionado a cada poço e agitado suavemente por 20 min. O corante foi então aspirado e os poços foram lavados com água destilada até que o sobrenadante estivesse limpo. 200 µL de cloreto de cetilpiridínio a 10% foram então adicionados aos poços e agitados por 30 min. Em seguida, 100 µL de cada poço foram transferidos em triplicata para uma nova placa de cultura de fundo plano de 96 poços e a densidade óptica foi medida usando um espectrofotômetro (Biotek, uQuant) a 550 nm. Os resultados são expressos em porcentagem da área mineralizada em relação à área total analisada.

#### 5.4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

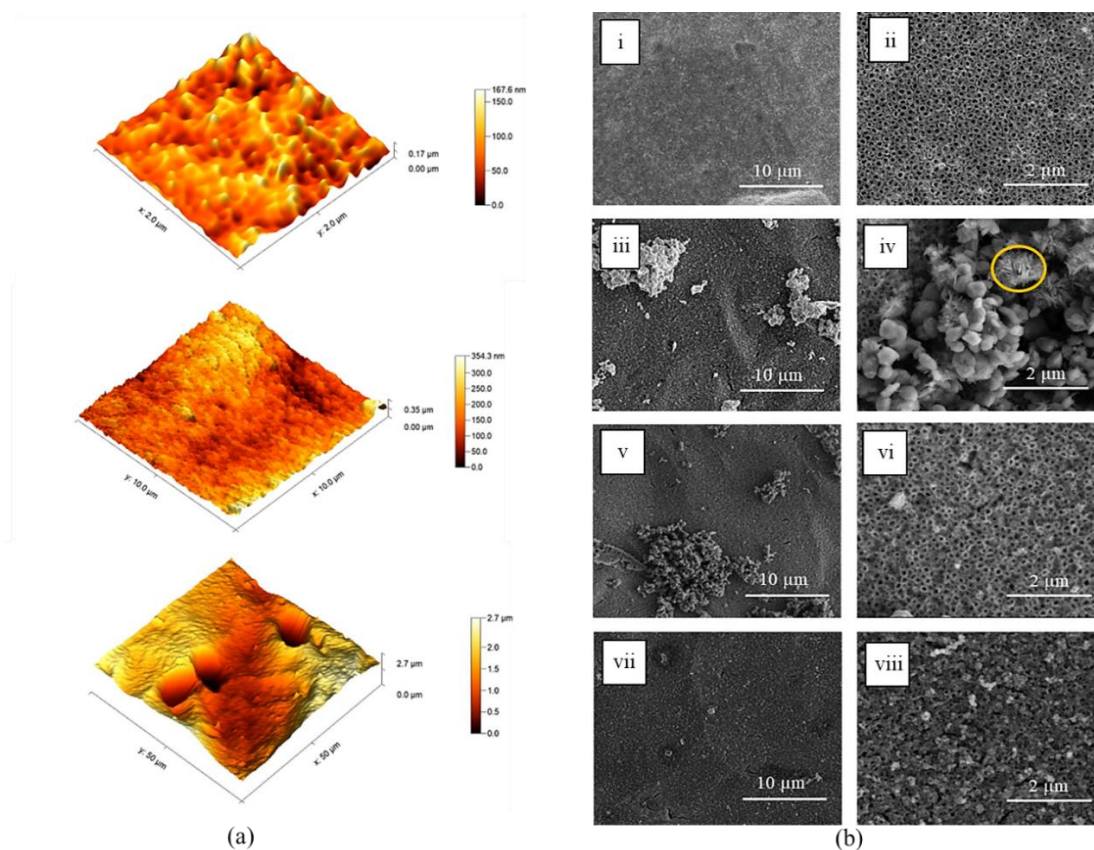
A análise estatística dos ensaios biológicos foi realizada com ANOVA *one-way* seguida do teste de Tukey utilizando o software GraphPad 8.0. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e a significância estatística foi estabelecida em 5%.

### 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 24a mostra imagens de AFM de uma amostra NT de Ti preparada neste estudo. Uma superfície nitidamente irregular com micro e nanoporosidade pode ser observada, o que é devido à presença de nanotubos de TiO<sub>2</sub>. Além disso, as imagens foram feitas em ampliações menores (50 × 50 µm) revelam as características micrométricas da superfície. A rugosidade média aritmética (Ra) avaliada para este material foi de 317 ± 43 nm. Tais propriedades de superfície têm sido relatadas para

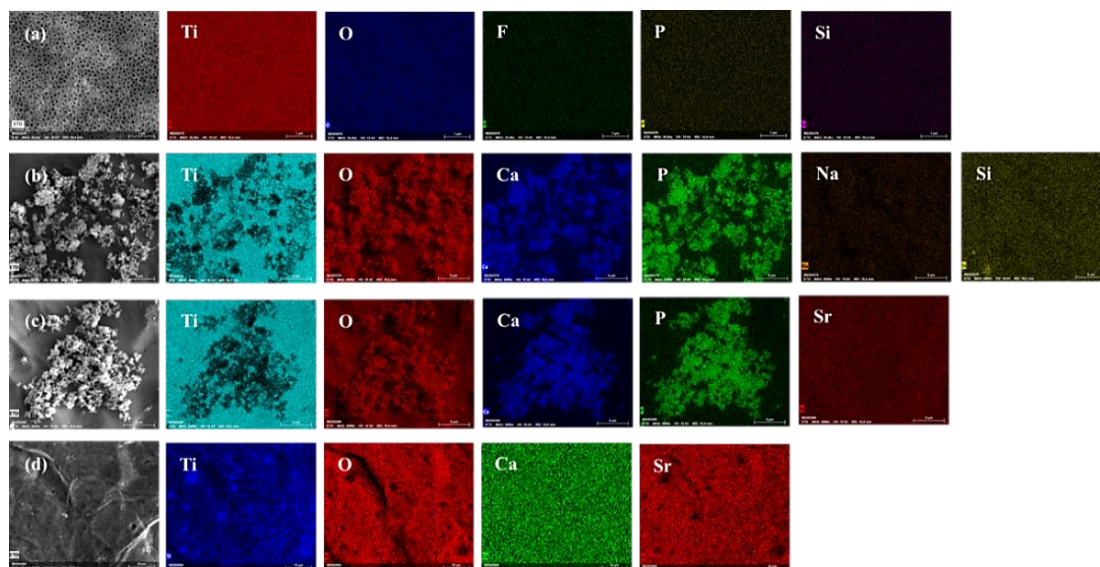
melhorar significativamente a diferenciação, proliferação e mineralização de osteoblastos durante a osseointegração [40-42]. As Figuras 24b-i e 24b-ii mostram micrografias MEV da superfície NT, revelando uma camada uniforme de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  medindo aproximadamente 100 nm de diâmetro. As Figuras 24b-iii e 24b-iv mostram micrografias do material após imersão em CaP, enquanto as Figuras 24b-v e 24b-vi exibem imagens após imersão em CaP + RSr. Dois tipos de depósitos superficiais, estruturas semelhantes a agulhas e cristalitos, são observados nessas imagens. As Figuras 24b-vii e 24b-viii exibem micrografias da superfície NT após imersão em solução de RSr. Não há diferenças perceptíveis nas imagens MEV de aumento inferior mostradas nas Figuras 24b-i e 24b-vii. No entanto, a Figura 24b-viii não mostra a topografia característica dos nanotubos de  $\text{TiO}_2$  em comparação com a Figura 24b-ii, indicando bloqueio parcial dos poros como resultado da deposição de RSr. No entanto, vale ressaltar que não houve bloqueio completo do  $\text{TiO}_2$  nanotubos, o que é uma característica desejável.

**Figura 24:** (a) Imagens AFM de superfícies NT mostrando diferentes aspectos da topografia da superfície. (b) Imagens de MEV obtidas para amostras preparadas neste estudo. (i-ii) amostra de Ti nanotubular; (iii-iv) amostra modificada com CaP; (v-vi) amostra modificada com CaP e RSr; (vii-viii) amostra modificada com RSr. O círculo amarelo indica a presença de estruturas semelhantes a agulhas nas amostras modificadas, típicas de compostos de CaP.

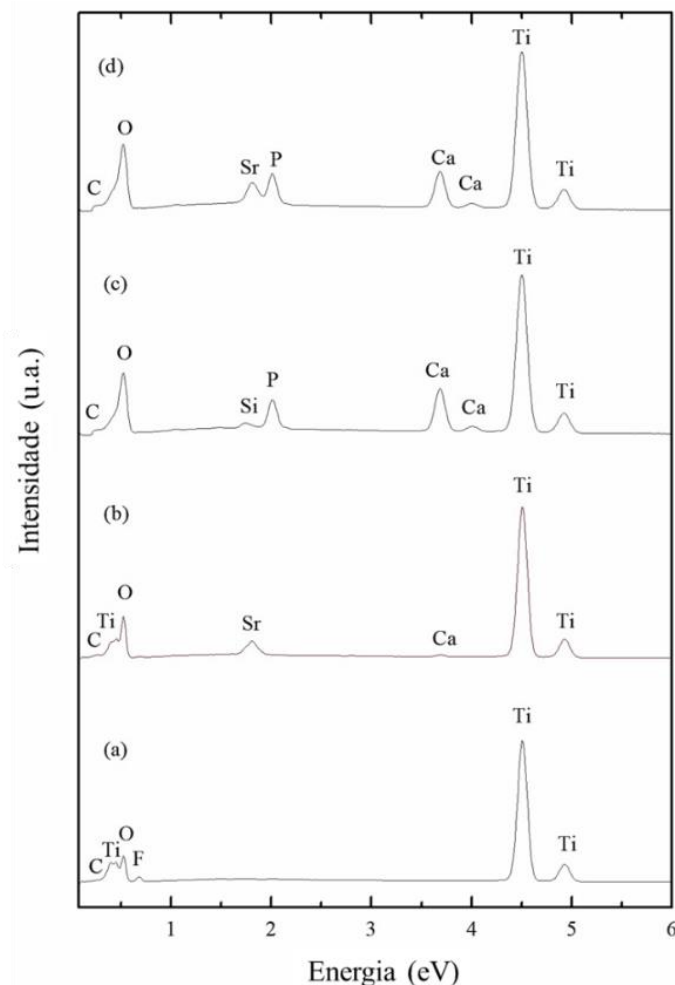


A Figura 25 mostra os mapas químicos EDS obtidos para amostras NT antes e após a imersão em soluções de CaP, CaP + RSr e RSr. A Figura 26 mostra os espectros de EDS coletados para esses materiais, identificando picos correspondentes a C, Ti, F, O, Si, Ca, P e Sr. O pico de Si provavelmente vem de polimento abrasivo, F é introduzido durante a etapa de anodização e C advém de contaminação orgânica.

**Figura 25:** Mapeamento EDS obtido para a amostra NT (a) antes e após a imersão em (b) soluções de CaP, (c) CaP + RSr e (d) RSr.



**Figura 26:** Espectros de EDS coletados para a superfície do NT (a) antes e após a imersão em (b) soluções de RSr, (c) CaP e (d) CaP + RSr.



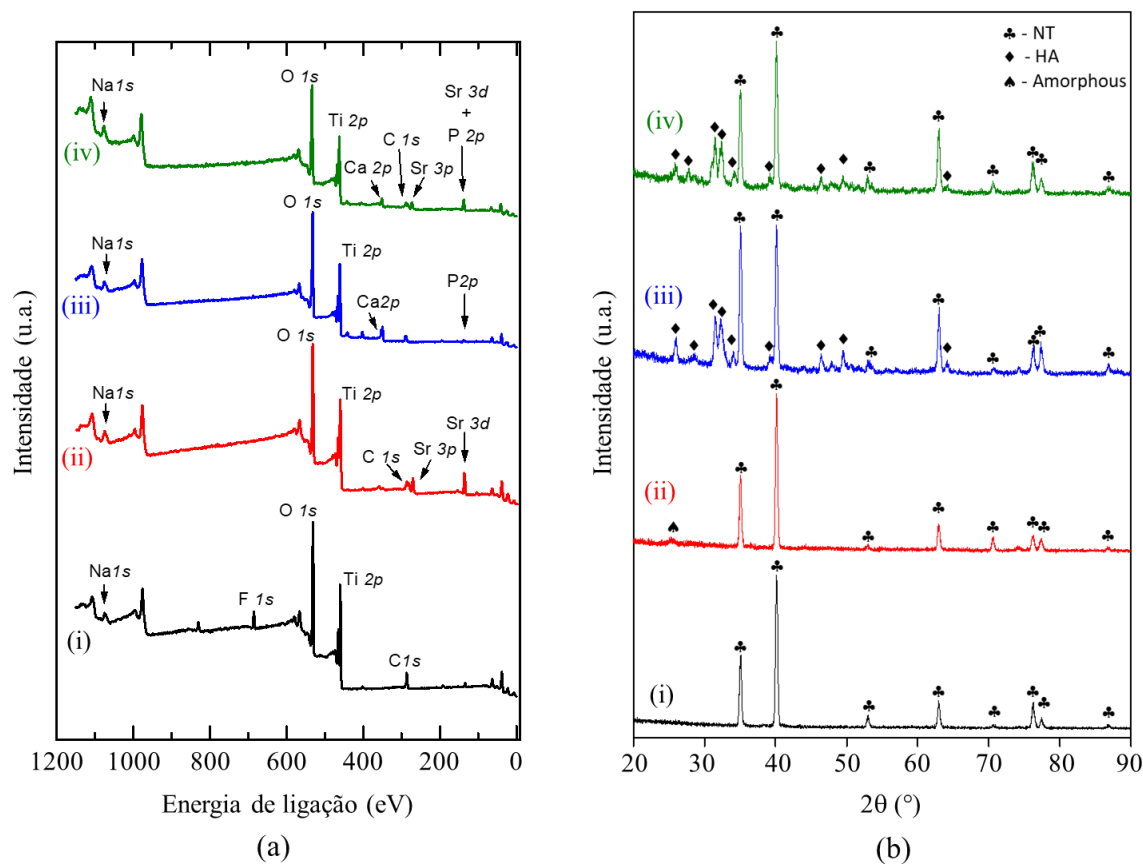
A Figura 27a mostra o levantamento dos espectros XPS obtidos para a superfície NT antes e após a imersão em soluções de CaP e RSr. Estes resultados confirmam que a superfície de Ti foi coberta após o processo de imersão, como evidenciado pela presença dos picos de Ca 2p, P 2p, Sr 3p e Sr 3d nos espectros de EDS. Além disso, a presença de picos de Na 1s ressalta a eficácia do pré-tratamento com NaOH. O XPS é uma ferramenta valiosa para a caracterização dos compostos de CaP formados nas superfícies estudadas, como evidenciado pelas relações Ca/P resumidas na Tabela 8. A amostra imersa na solução de CaP apresentou relação Ca/P de 2,0, indicando a formação de tetrafosfato de cálcio ( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ). A superfície imersa na solução CaP + RSr apresentou relação Ca/P de 1,7, notavelmente próxima da relação tipicamente observada para hidroxiapatita (HA), que é de 1,67 [43,44].

**Tabela 8:** Composição química elementar determinada pelo XPS (at.%).

<b>Amostra</b>	O	N	C	Ti	F	Na	P	Ca	Sr	Ca/P
Ti	53.1	1.6	19.5	18.6	4.6	2.6	-	-	-	-
CaP	54.2	4.8	13.0	16.1	-	3.0	2.9	5.8	-	2.0
Sr	54.7	1.3	19.2	17.6	-	4.6	-	-	2.6	-
CaP+RSr	55.4	-	17.0	16.5	-	4.4	1.8	3.1	1.8	1.7

A Figura 27b mostra os padrões GIXRD das amostras aqui preparadas. Todas as amostras apresentam a presença de picos de Ti relacionados ao substrato e à camada NT. A amostra imersa em RSr também mostra um pico de baixa intensidade em torno de 25°, indicando a incorporação de RSr ao material como uma fase amorfa. Picos de difração atribuídos a HA são observados na amostra imersa na solução de CaP. A amostra imersa em CaP + RSr mostra a presença de HA, confirmando a deposição deste composto. As análises XPS e GIXRD indicam a presença dos mesmos compostos nas amostras examinadas. As diferenças na caracterização observadas para a amostra de CaP podem ser atribuídas às diferentes profundidades investigadas por essas técnicas. XPS é uma técnica sensível à superfície que caracteriza regiões dentro de alguns angstroms da superfície da amostra, enquanto GIXRD sonda profundidades na faixa de micrômetros [45].

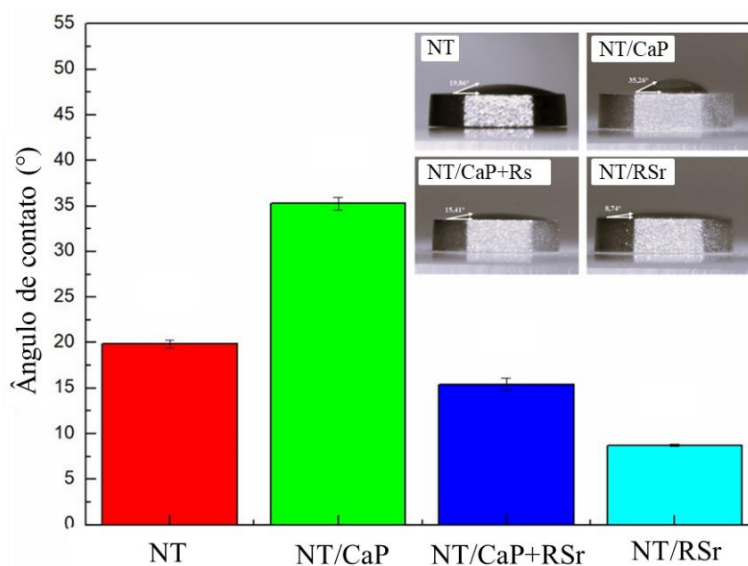
**Figura 27:** (a) levantamento dos espectros XP e (b) padrões GIXRD da superfície NT antes (i) e, após a imersão em soluções RSr (ii), CaP (iii) e RSr + CaP (iv).



Todas as amostras testadas exibiram propriedades hidrofílicas nos ensaios de molhabilidade mostrados na Figura 28, evidenciadas por ângulos de contato abaixo de  $90^\circ$ . Especificamente, a deposição de CaP nas superfícies NT reduziu sua hidrofilicidade, aumentando o ângulo de contato de  $19,9^\circ$  para  $35,3^\circ$ . Por outro lado, a imersão das amostras NT na solução de RSr aumentou sua hidrofilicidade e promoveu melhor molhabilidade, reduzindo o ângulo de contato para  $8,7^\circ$ . A imersão em uma solução de CaP + RSr produz um intermediário de molhabilidade entre as duas superfícies mencionadas anteriormente, confirmando a influência do CaP e do RSr nas propriedades de molhabilidade do Ti. Com um ângulo de contato de  $15,4^\circ$ , sugere uma influência competitiva dos compostos depositados, resultando em uma molhabilidade equilibrada.



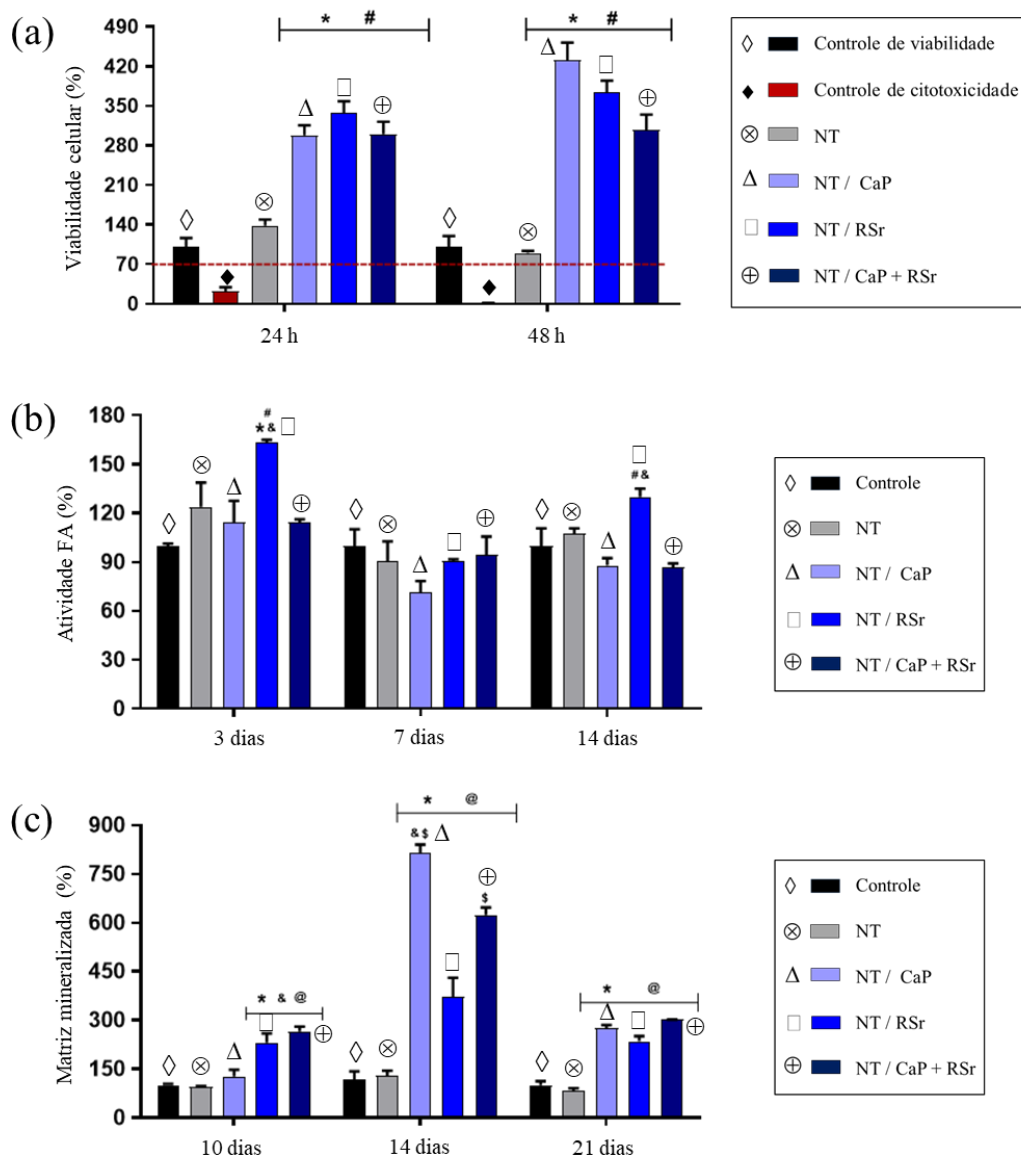
**Figura 28:** medidas do ângulo de contato da superfície NT antes e após a imersão nas soluções CaP, CaP + RSr e RSr.



A Figura 29a mostra os ensaios de MTT realizados neste trabalho. A viabilidade celular manteve-se consistentemente acima de 70% para todas as superfícies ao longo de 24 h e 48 h. De fato, o número de células viáveis excede o dos grupos NT e controle, ressaltando a natureza não citotóxica das superfícies e os efeitos benéficos dos revestimentos. Embora a amostra imersa na solução de CaP tenha um ângulo de contato maior (Figura 28), os resultados do MTT indicam que a química de superfície desempenha um papel muito mais importante do que a molhabilidade na manutenção da viabilidade celular. Os resultados da FA na figura 29b mostram que a deposição isolada de RSr resultou em diferenciação celular superior em 3 dias. Embora a diferenciação celular tenha sido temporariamente reduzida aos 7 dias, ela atingiu níveis mais elevados em 14 dias, superando as demais superfícies. Esse resultado demonstra que o RSr desempenha um papel importante na diferenciação celular. Esse comportamento pode estar relacionado tanto à química da superfície quanto ao menor ângulo de contato (8,7 ° – Figura 28) das amostras modificadas por RSr, o que resulta em maior contato superfície-célula. Além dos efeitos da química de superfície, vale ressaltar que a superfície pode ativar mecanismos de mecanotransdução nas células. Essa ativação induz as células mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos, como descrito por Nikukar *et al.* [17]. Vale ressaltar que, mesmo após 14 dias, o grupo NT ainda apresenta melhor diferenciação celular do que as superfícies CaP e CaP+ RSr. Isso destaca a influência da topografia da superfície no processo de diferenciação celular.

A Figura 29c mostra que a deposição mineral foi significativamente maior em todas as amostras funcionalizadas do que nas amostras controle e NT ( $p < 0,05$ ), com as amostras modificadas com CaP e CaP + RSr exibindo os maiores teores. Após 10 dias, a matriz mineralizada observada para as amostras RSr e CaP + RSr era quase o dobro do controle, e no 14<sup>o</sup> dia, os valores para todas as amostras funcionalizadas, especialmente as superfícies CaP e CaP + RSr, eram pelo menos três vezes maiores. Isso indica que as superfícies CaP e CaP + RSr, em particular, podem acelerar a deposição de matriz mineralizada bem antes da marca esperada de 21 dias. A subsequente diminuição da matriz mineralizada aos 21 dias pode ser atribuída à sua deposição acelerada em apenas 14 dias. Isso demonstra que o CaP promove a deposição mineral devido à sua semelhança química com o osso natural, enquanto a RSr desempenha um papel mais importante na diferenciação e no aumento da molhabilidade.

**Figura 29:** (a) ensaio de MTT mostrando a viabilidade das células MC3T3-E1 após 24 ou 48 h. (b) atividade da fosfatase alcalina (FA) medida após 3, 7 ou 14 dias. (c) mineralização da matriz extracelular após 10, 14 e 21 dias de cultivo. \* $p < 0,05$  vs. grupo controle; # $p < 0,05$  vs. NT/CaP; @ $p < 0,05$  vs. NT; & $p < 0,05$  vs. NT / CaP + RSr.



Os valores de difusividade térmica para as amostras aqui testadas são apresentados na Tabela 9. Estes valores de difusividade térmica são calculados em média a partir de 10 medições consecutivas realizadas em condições repetidas. A incerteza relativa expandida da difusividade térmica (fator de cobertura  $k = 2$ ) foi estimada em 7,5%. Os resultados mostram que não houve diferença significativa na difusividade térmica entre as amostras examinadas. Esses resultados indicam que a transferência de calor dos espécimes com e sem a camada NT é equivalente e que não haveria diferença no aquecimento durante o implante cirúrgico. Estudos anteriores destacaram o risco

potencial de dano tecidual durante a preparação de implantes de Ti devido ao calor gerado dentro do corpo [46, 47]. Para mitigar essas preocupações, é fundamental favorecer a dissipação do calor gerado durante o processo de implantação através da superfície. Vale ressaltar que o processo de anodização realizado neste estudo não alterou as propriedades térmicas do Ti, mantendo sua capacidade de manter a dissipação de calor.

**Tabela 9:** Difusividade térmica medida a 25 °C.

<b>Amostra</b>	<b>Difusividade térmica (m<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>)</b>
Superfície NT 1	6,55
Superfície NT 2	6,70
Superfície NT 3	6,51
Superfície da base 1	6,65
Superfície da base 2	6,69
Superfície do base 3	6,64

As modificações superficiais implementadas neste estudo têm grande potencial para melhorar o uso de superfícies de Ti em aplicações biomédicas. A camada NT formada por anodização fornece uma plataforma versátil para a incorporação de várias espécies, como CaP e RSr, devido à presença de múltiplos locais, incluindo nanotubos de TiO<sub>2</sub>, que criam condições favoráveis para sua incorporação. A superfície interna dos nanotubos de TiO<sub>2</sub> aumenta significativamente a área de superfície disponível para a incorporação dessas espécies. Testes de molhabilidade confirmaram a energia superficial, reatividade e hidrofiliabilidade relativamente altas dessas camadas. Além disso, a camada porosa atua como uma matriz capaz de se ligar a grupos hidroxila ou compostos como fármacos, resultando em múltiplos locais na superfície do Ti para reações e modificações químicas. A estrutura do NT tem grande potencial para incorporar substâncias como fármacos, antibióticos e espécies iônicas, que podem então ser liberadas durante o processo de osseointegração, aumentando as propriedades biomédicas dessas interfaces de várias maneiras. A Tabela 10 resume os trabalhos recentes sobre a modificação de superfícies nanotubulares de Ti. Nota-se que diferentes métodos de modificação têm sido aplicados a esta superfície, destacando-se sua

versatilidade e a possibilidade de modificá-la com diferentes compostos. Neste estudo, foi demonstrado que as células responderam de forma positiva às modificações de superfície empregadas, reforçando ainda mais o seu potencial para aplicações biomédicas.

**Tabela 10:** Trabalhos recentes sobre modificação de superfícies nanotubulares de Ti.

<b>Referência</b>	<b>Deposição</b>	<b>Método</b>	<b>Observações</b>
Este trabalho	Fosfato de cálcio / Ranelato de Sr	Imersão	RSr desempenhou um papel na diferenciação celular e as superfícies preparadas mostraram a capacidade de acelerar a deposição mineral.
Wang <i>et al.</i> , 2023 [48]	Hidroxiapatita	Pressão negativa	Fortes ligações foram formadas entre as superfícies de TiO <sub>2</sub> e hidroxiapatita, e testes de osseointegração <i>in vivo</i> foram realizados.
Simon <i>et al.</i> , 2022 [49]	Ag	Imersão	A biocompatibilidade e o desempenho antimicrobiano foram demonstrados nas amostras preparadas.
Cao <i>et al.</i> , 2022 [50]	Óxido de grafeno	Eletrodeposição	As superfícies apresentaram maior reatividade biológica.
Iyoon Jariya <i>et al.</i> [51]	Ciprofloxacina/vaterita/óxido de grafeno reduzido/policaprolactona	Método de precipitação/Dip-coating	As superfícies apresentaram maior reatividade biológica e liberação lenta de antibióticos.

Travo <i>et al.</i> [52]	Peptídeos	Imersão	A diferenciação osteoblástica e a atividade antibacteriana foram demonstradas nas superfícies preparadas.
Qiaoxia <i>et al.</i> [53]	Hidroxiapatita/ácido tânico	Imersão	O revestimento resultante mostrou boa citocompatibilidade para proliferação e adesão osteoblástica.
Yan <i>et al.</i> [54]	Interleucina-4	Imersão	A superfície apresentou regulação anti-inflamatória.
Panela <i>et al.</i> [55]	Zn	Tratamento hidrotérmico	A superfície melhorou a compatibilidade sanguínea e promoveu endotelização.
Piszczeck <i>et al.</i> [56]	Nanopartículas de Ag	Deposição química de vapor	A superfície modificada com Ag demonstrou forte atividade bactericida e fungicida.
Es-Souni <i>et al.</i> [57]	Polímero Zwitter iônico	Imersão e fotoexertia	A camada funcionalizada apresentou alta repelência proteica e bacteriana
Li <i>et al.</i> [58]	Proteína morfogenética óssea	Carregamento	A superfície promoveu a adesão, proliferação, diferenciação e osseointegração iniciais dos osteoblastos.
Wei <i>et al.</i> [59]	Exossomo	Incubação	A superfície melhorou a biofuncionalidade dos nanotubos de Ti.

Yazici <i>et al.</i> [60]	Peptídeos/fosfato de cálcio	Incubação/ deposição eletroquímica	A superfície peptídica apresentou atividade antimicrobiana e o fosfato de cálcio foi formado com sucesso.
Zhang <i>et al.</i> [61]	Hidroxiapatita	Deposição eletroquímica	A superfície apresentou biocompatibilidade e um forte intertravamento mecânico entre a hidroxiapatita e os nanotubos foi observado.
Radtke <i>et al.</i> [62]	Nanopartículas de Ag	Deposição química de vapor	A superfície apresentou alta atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e não citotoxicidade.
Bartmanski <i>et al.</i> [63]	(nano)hidroxiapatita/ nanocobre	Método eletroforético	Hidroxiapatita tem sido observada dentro da estrutura nanotubular e as deposições aumentam a molhabilidade das superfícies.

## 5.6 CONCLUSÕES

A funcionalização superficial de superfícies NT de Ti é uma estratégia promissora para melhorar a osseointegração. Neste estudo, foi investigado o efeito de CaP, RSr e uma combinação desses compostos sobre a química de superfície, molhabilidade, viabilidade celular, diferenciação celular e capacidade de mineralização de superfícies de Ti. A análise microscópica revelou a presença de depósitos sem obstruir os nanotubos de TiO<sub>2</sub>. A composição química das superfícies e a eficácia do processo de modificação química foram confirmadas por análises de EDS, XPS e DRX. Os testes de molhabilidade ressaltaram a natureza química distinta das superfícies e destacaram o

efeito significativo da RSr sobre o Ti. Os ensaios de MTT mostraram que todas as superfícies eram não-citotóxicas e mantiveram melhor viabilidade celular em comparação com os grupos NT e controle, especialmente no caso das amostras revestidas com CaP. Curiosamente, apesar das maiores medidas de ângulo de contato associadas à melhor viabilidade celular, é evidente que a química de superfície desempenha um papel primário. Nos ensaios de FA, embora a diferenciação celular tenha sido temporariamente reduzida em 7 dias para a amostra modificada por RSr, ela atingiu níveis mais altos em 14 dias, superando as outras superfícies. Esse achado mostra que o RSr desempenha um papel importante na diferenciação celular. RSr e CaP+ RSr apresentaram maior deposição mineral em apenas 10 dias. No entanto, todas as superfícies funcionalizadas aceleraram significativamente a deposição mineral em 14 dias, superando a superfície NT e o grupo controle. Dentre as superfícies funcionalizadas, as superfícies revestidas com CaP apresentaram a maior deposição mineral, seguidas pelas superfícies CaP + RSr. Isso indica que o CaP também tem um efeito positivo sobre a deposição mineral. Os resultados obtidos sugerem que a funcionalização superficial de superfícies nanoporosas de Ti com CaP e RSr é uma abordagem promissora para melhorar a osseointegração. São necessários estudos adicionais para otimizar a concentração de RSr na mistura e investigar o desempenho a longo prazo dessas superfícies funcionalizadas no osso.



## 5.7 REFERÊNCIAS

- [1] M. Khodaei, S. Hossein Kelishadi, The effect of different oxidizing ions on hydrogen peroxide treatment of titanium dental implant, *Surf. Coatings Technol.* 353 (2018) 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.08.037>.
- [2] P.-I. Brånemark, U. Breine, R. Adell, B.O. Hansson, J. Lindström, Å. Ohlsson, Intra-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 3 (1969) 81–100. <https://doi.org/10.3109/02844316909036699>.
- [3] L.M. Bjursten, L. Rasmusson, S. Oh, G.C. Smith, K.S. Brammer, S. Jin, Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding *in vivo*, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 92A (2010) 1218–1224. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32463>.
- [4] H. Jiang, T. Zhang, W. Zhou, Z. Lin, Z. Liu, Effect of plasma oxidation –Treated TiOx film on early osseointegration, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 33 (2018) 1011–1018. <https://doi.org/10.11607/jomi.6680>.
- [5] Y. Li, W. Wang, H. Liu, J. Lei, J. Zhang, H. Zhou, M. Qi, Formation and *in vitro/in vivo* performance of "cortex-like" micro/nano-structured TiO<sub>2</sub> coatings on titanium by micro-arc oxidation, *Mater. Sci. Eng. C.* 87 (2018) 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.02.023>.
- [6] M. Tak, H. Tomar, R.G. Mote, Synthesis of titanium nanotubes (TNT) and its influence on electrochemical micromachining of titanium, *Procedia CIRP.* 95 (2020) 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2020.01.140>.
- [7] A. Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review, *Clin. Oral Implants Res.* 20 (2009) 172–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x>.
- [8] S. Oh, C. Daraio, L.-H. Chen, T.R. Pisanic, R.R. Fiñones, S. Jin, Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 78A (2006) 97–103. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30722>.
- [9] Y.-T. Sul, Electrochemical growth behavior, surface properties, and enhanced *in vivo* bone response of TiO<sub>2</sub> nanotubes on microstructured surfaces of blasted, screw-shaped titanium implants, *Int. J. Nanomedicine.* 5 (2010) 87–100. <https://doi.org/10.2147/IJN.S8012>.
- [10] E. Gongadze, D. Kabaso, S. Bauer, T. Slivnik, P. Schmuki, U. van Rienen, A. Iglič, Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface, *Int. J. Nanomedicine.* 6 (2011) 1801–1816. <https://doi.org/10.2147/ijn.s21755>.
- [11] D. V. Portan, A.A. Kroustalli, D.D. Deligianni, G.C. Papanicolaou, On the biocompatibility between TiO<sub>2</sub> nanotubes layer and human osteoblasts, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 100 A (2012) 2546–2553. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34188>.

- [12] A.N. Gravina, A.A. Rubert, M. Bertuola, M. Fernández Lorenzo de Mele, Bioactivity enhancement of cerium-containing titanium oxide nanotubes. Relationship between surface reactivity and nanostructuring process, *Surf. Coatings Technol.* 378 (2019) 124968. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.124968>.
- [13] D. Buser, N. Broggini, M. Wieland, R.K. Schenk, A.J. Denzer, D.L. Cochran, B. Hoffmann, A. Lussi, S.G. Steinemann, Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface, *J. Dent. Res.* 83 (2004) 529–533. <https://doi.org/10.1177/154405910408300704>.
- [14] F. Wang, C. Li, S. Zhang, H. Liu, Tantalum coated on titanium dioxide nanotubes by plasma spraying enhances cytocompatibility for dental implants, *Surf. Coatings Technol.* 382 (2019) 125161. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.125161>.
- [15] E. Marchezini, F.P. Oliveira, R. Lopes, T. Almeida, P.L. Gastelois, M.D. Martins, Controlling morphological parameters of a nanotubular TiO<sub>2</sub> coating layer prepared by anodic oxidation, *Mater. Res. Express.* 7 (2020) 25017. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6f35>.
- [16] E. Marchezini, T.C.S. de Almeida, F. de P. Oliveira, J.D.S. Albergaria, S. Ghosh, M.A.B. Tavares, R.R. Leite, G.A.B. Silva, M.D. Martins, Comparative study of nanostructured TiO<sub>2</sub> and SLA surface modifications for titanium implants: Surface morphology and in vitro evaluation, *Mater. Res.* 25 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2021-0613>.
- [17] H. Nikukar, S. Reid, P.M. Tsimbouri, M.O. Riehle, A.S.G. Curtis, M.J. Dalby, Osteogenesis of mesenchymal stem cells by nanoscale mechanotransduction, *ACS Nano.* 7 (2013) 2758–2767. <https://doi.org/10.1021/nn400202j>.
- [18] Y. Li, B. Li, Y. Song, A. Ma, C. Li, X. Zhang, H. Li, Q. Zhang, K. Zhang, Improved osteoblast adhesion and osseointegration on TiO<sub>2</sub> nanotubes surface with hydroxyapatite coating, *Dent. Mater. J.* 38 (2019) 278–286. <https://doi.org/10.4012/dmj.2018-118>.
- [19] H. Li, B. Nie, S. Zhang, T. Long, B. Yue, Immobilization of type I collagen/hyaluronic acid multilayer coating on enoxacin loaded titania nanotubes for improved osteogenesis and osseointegration in ovariectomized rats, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 175 (2019) 409–420. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.033>.
- [20] R.Z. LeGeros, Calcium phosphate-based osteoinductive materials, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4742–4753. <https://doi.org/10.1021/cr800427g>.
- [21] A.M.C. Barradas, H. Yuan, C.A. van Blitterswijk, P. Habibovic, Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms, *Eur. Cell. Mater.* 21 (2011) 407–429. <https://doi.org/10.22203/eCM.v021a31>.

- [22] A.P. dos R. Weitzel, R. de Mendonça, P.C. Azzi, G.M. Vieira, T.C.S. de Almeida, C.F. Rodrigues, E.M. Rodrigues, J.G.A. de Siqueira, E.H.M. Nunes, M.D. Martins, Comparative study of calcium phosphate deposition on nanotubular and sandblasted large grit acid-etched titanium substrates, *Surf. Coatings Technol.* In Press (2023) 130036. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2023.130036>.
- [23] N. Mardas, X. Dereka, A. Stavropoulos, M. Patel, N. Donos, The role of strontium ranelate and guided bone regeneration in osteoporotic and healthy conditions, *J. Periodontal Res.* 56 (2021) 330–338. <https://doi.org/10.1111/jre.12825>.
- [24] B. Kołodziejaska, N. Stępień, J. Kolmas, The influence of strontium on bone tissue metabolism and its application in osteoporosis treatment, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 6564. <https://doi.org/10.3390/ijms22126564>.
- [25] C. Ge, F. Chen, L. Mao, Q. Liang, Y. Su, C. Liu, Strontium ranelate-loaded POFC/ $\beta$ -TCP porous scaffolds for osteoporotic bone repair, *RSC Adv.* 10 (2020) 9016–9025. <https://doi.org/10.1039/C9RA08909H>.
- [26] J.-Y. Reginster, M.-L. Brandi, J. Cannata-Andía, C. Cooper, B. Cortet, J.-M. Feron, H. Genant, S. Palacios, J.D. Ringe, R. Rizzoli, The position of strontium ranelate in today's management of osteoporosis, *Osteoporos. Int.* 26 (2015) 1667–1671. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3109-y>.
- [27] M.M. Almeida, E.P. Nani, L.N. Teixeira, D.C. Peruzzo, J.C. Joly, M.H. Napimoga, E.F. Martinez, Strontium ranelate increases osteoblast activity, *Tissue Cell.* 48 (2016) 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.03.009>.
- [28] A.L. Rossi, S. Moldovan, W. Querido, A. Rossi, J. Werckmann, O. Ersen, M. Farina, Effect of strontium ranelate on bone mineral: Analysis of nanoscale compositional changes, *Micron.* 56 (2014) 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.09.008>.
- [29] A. Alenezi, S. Galli, S. Atefyekta, M. Andersson, A. Wennerberg, Osseointegration effects of local release of strontium ranelate from implant surfaces in rats, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 30 (2019) 116. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6314-y>.
- [30] Y. Dang, L. Zhang, W. Song, B. Chang, T. Han, Y. Zhang, L. Zhao, In vivo osseointegration of Ti implants with a strontium-containing nanotubular coating, *Int. J. Nanomedicine.* 11 (2016) 1003–1011. <https://doi.org/10.2147/IJN.S102552>.
- [31] K.S. Raja, M. Misra, K. Paramguru, Deposition of calcium phosphate coating on nanotubular anodized titanium, *Mater. Lett.* 59 (2005) 2137–2141. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.01.084>.

- [32] K. Alagarsamy, V. Vishwakarma, G.S. Kaliaraj, K. Viswanathan, M. Chavali, Implant application of bioactive nano-hydroxyapatite powders - a comparative study, *Mater. Res. Express.* 5 (2018) 15405. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aaa6e7>.
- [33] F. Guo, C. Yuan, H. Huang, X. Deng, Z. Bian, D. Wang, K. Dou, L. Mei, Q. Zhou, Regulation of T cell responses by nano-hydroxyapatite to mediate the osteogenesis, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10 (2022) 884291. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.884291>.
- [34] X. Guo, S. Wei, M. Lu, Z. Shao, J. Lu, L. Xia, K. Lin, D. Zou, Dose-dependent effects of strontium ranelate on ovariectomy rat bone marrow mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells, *Int J Biol Sci.* 12 (2016) 1511–1522. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16499>.
- [35] D. Flanagan, Heat generated during seating of dental implant fixtures, *J. Oral Implantol.* 40 (2014) 174–181. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-13-00261>.
- [36] S. Livne, N. Harel, D. Piek, Z. Ormianer, Evaluation of heat conduction in dental implants after exposure to hot beverages, *J. Prosthet. Dent.* 111 (2014) 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2013.10.003>.
- [37] D. Mailliet, S. André, J.C. Batsale, *Thermal quadrupoles: Solving the heat equation through integral transforms - 1st Edition*, Wiley, London, 2000.
- [38] A. Degiovanni, B. Remy, S. Andre, Transient radiation-conductive heat transfer problems: "The quadrupole method", *J. Therm. Sci.* 11 (2002) 359–371. <https://doi.org/10.1007/s11630-002-0050-0>.
- [39] JCGM 100:2008 - Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement, 2008.
- [40] P. Mu, Y. Li, Y. Zhang, Y. Yang, R. Hu, X. Zhao, A. Huang, R. Zhang, X. Liu, Q. Huang, C. Lin, High-throughput screening of rat mesenchymal stem cell behavior on gradient TiO<sub>2</sub> nanotubes, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 2804–2814. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00488>.
- [41] W.Q. Yu, X.Q. Jiang, F.Q. Zhang, L. Xu, The effect of anatase TiO<sub>2</sub> nanotube layers on MC3T3-E1 preosteoblast adhesion, proliferation, and differentiation, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 94 (2010) 1012–1022. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32687>.
- [42] K. Von Der Mark, S. Bauer, J. Park, P. Schmuki, Another look at "Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 2130–2135. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903663106>.
- [43] A. Thirugnanam, T.S. Sampath Kumar, U. Chakkingal, Tailoring the bioactivity of commercially pure titanium by grain refinement using groove pressing, *Mater. Sci. Eng. C.* 30 (2010) 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.002>.

- [44] M. Li, M. Wang, L. Wei, A. Werner, Y. Liu, Biomimetic calcium phosphate coating on medical grade stainless steel improves surface properties and serves as a drug carrier for orthodontic applications, *Dent. Mater.* 39 (2023) 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2022.12.009>.
- [45] J.R. Davis, *Corrosion: Understanding the Basics*, ASTM International, 2000.
- [46] U. Brägger, W. Wermuth, E. Török, Heat generated during preparation of titanium implants of the ITI® Dental Implant System: an in vitro study, *Clin. Oral Implants Res.* 6 (1995) 254–259. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1995.060409.x>.
- [47] M.G. Kutty, S.B. Bhaduri, Gradient surface porosity in titanium dental implants: relation between processing parameters and microstructure, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15 (2004) 145–150. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000011815.50383.bd>.
- [48] Y. Wang, S. Tang, N. Ding, Z. Zhang, Biological properties of hydroxyapatite coatings on titanium dioxide nanotube surfaces using negative pressure method, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 111 (2023) 1365–1373. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35240>.
- [49] A.P. Simon, A.S. de Lima, V.A.Q. Santos, J.S. Santos, F. Trivinho-Strixino, M. de S. Sikora, Optimization of TiO<sub>2</sub> coatings properties and photochemical Ag-functionalization: Implications on bioactivity and antibacterial activity, *J. Mater. Res.* 37 (2022) 4243–4254. <https://doi.org/10.1557/s43578-022-00790-0>.
- [50] X. Cao, K. Wu, C. Wang, Y. Guo, R. Lu, X. Wang, S. Chen, Graphene oxide loaded on TiO<sub>2</sub>-nanotube-modified Ti regulates the behavior of human gingival fibroblasts, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 8723. <https://doi.org/10.3390/ijms23158723>.
- [51] S.A. Iynoon Jariya, A.A. Babu, T.S.N. Sankara Narayanan, E. Vellaichamy, K. Ravichandran, Development of a novel smart carrier for drug delivery: Ciprofloxacin loaded vaterite/reduced graphene oxide/PCL composite coating on TiO<sub>2</sub> nanotube coated titanium, *Ceram. Int.* 48 (2022) 9579–9594. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.12.156>.
- [52] Q. Tang, W. Wang, X. Zhang, X. Fang, C. Zhang, Z. Zhu, Y. Hou, M. Lai, Bi-functionalization of titanium with a mixture of peptides for improving its osteogenic and antibacterial activity, *Colloid Interface Sci. Commun.* 51 (2022) 100673. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2022.100673>.
- [53] L. Qiaoxia, Z. Yujie, Y. Meng, C. Yizhu, W. Yan, H. Yinchun, L. Xiaojie, C. Weiyi, H. Di, Hydroxyapatite/tannic acid composite coating formation based on Ti modified by TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 196 (2020) 111304. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111304>.
- [54] X. Yan, K. Shen, Q. Tang, X. Fang, C. Zhang, Z. Zhu, Y. Hou, M. Lai, IL-4

- functionalized titanium dioxide nanotubes modulate the inflammatory response of macrophages, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 31 (2020) 2238–2251. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1799534>.
- [55] C. Pan, Y. Hu, Z. Gong, Y. Yang, S. Liu, L. Quan, Z. Yang, Y. Wei, W. Ye, Improved blood compatibility and endothelialization of titanium oxide nanotube arrays on titanium surface by zinc doping, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020) 2072–2083. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00187>.
- [56] P. Piszczek, A. Radtke, M. Ehlert, T. Jędrzejewski, A. Sznarkowska, B. Sadowska, M. Bartmański, Y.K. Erdoğan, B. Ercan, W. Jedrzejczyk, Comprehensive evaluation of the biological properties of surface-modified titanium alloy implants, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 342. <https://doi.org/10.3390/jcm9020342>.
- [57] M. Es-Souni, E. Wassel, M. Dietze, A. Laghrissi, F. Klöhn, T. Weyrich, M. Es-Souni, Processing of nanotubes on NiTi-shape memory alloys and their modification with photografted anti-adhesive polymer brushes. Towards smart implant surfaces, *Mater. Des.* 182 (2019) 108031. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108031>.
- [58] M. Lai, K. Cai, L. Zhao, X. Chen, Y. Hou, Z. Yang, Surface functionalization of TiO<sub>2</sub> nanotubes with bone morphogenetic protein 2 and its synergistic effect on the differentiation of mesenchymal stem cells, *Biomacromolecules.* 12 (2011) 1097–1105. <https://doi.org/10.1021/bm1014365>.
- [59] F. Wei, M. Li, R. Crawford, Y. Zhou, Y. Xiao, Exosome-integrated titanium oxide nanotubes for targeted bone regeneration, *Acta Biomater.* 86 (2019) 480–492. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.006>.
- [60] H. Yazici, G. Habib, K. Boone, M. Urgan, F.S. Utku, C. Tamerler, Self-assembling antimicrobial peptides on nanotubular titanium surfaces coated with calcium phosphate for local therapy, *Mater. Sci. Eng. C.* 94 (2019) 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.030>.
- [61] X. Zhang, D. Zhang, Q. Peng, J. Lin, C. Wen, Biocompatibility of nanoscale hydroxyapatite coating on TiO<sub>2</sub> nanotubes, *Materials (Basel).* 12 (2019) 1979. <https://doi.org/10.3390/ma12121979>.
- [62] A. Radtke, M. Grodzicka, M. Ehlert, T. Jędrzejewski, M. Wypij, P. Golińska, "To be microbiocidal and not to be cytotoxic at the same time..." - Silver nanoparticles and their main role on the surface of titanium alloy implants, *J. Clin. Med.* 8 (2019) 334. <https://doi.org/10.3390/jcm8030334>.
- [63] M. Bartmanski, A. Zielinski, M. Jazdzewska, J. Głodowska, P. Kalka, Effects of electrophoretic deposition times and nanotubular oxide surfaces on properties of the nanohydroxyapatite/nanocopper coating on the Ti<sub>13</sub>Zr<sub>13</sub>Nb alloy, *Ceram. Int.* 45 (2019) 20002–20010. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.06.258>.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 CONCLUSÕES

Sabe-se que a superfície SLA apresenta limitações na produção e estabilidade do implante, tornando a superfície NT uma alternativa promissora. Com o objetivo de aprimorar o desempenho dessas superfícies, nesse trabalho buscou-se modificá-las por meio da deposição de revestimentos biocompatíveis de compostos de CaP e RSr. Como principais conclusões desse estudo é possível citar:

- Todos os recobrimentos foram aplicados com sucesso nas superfícies SLA e NT. Nas deposições sobre a camada NT, os nanotubos de  $\text{TiO}_2$  não foram completamente obstruídos. Este resultado merece destaque, pois enfatiza a eficácia das metodologias utilizadas.
- As amostras SLA demonstraram maior microdureza, medindo  $311,5 \pm 28,5$  HV em comparação com as superfícies NT, com valor de  $244,9 \pm 22,2$  HV; o que está de acordo com estudos anteriores que atribuíram a alta dureza das superfícies SLA a mudanças estruturais induzidas pelo processo de jateamento. Por outro lado, a porosidade na superfície NT geralmente reduz a sua dureza.
- A rugosidade média  $R_a$  da superfície SLA foi significativamente maior do que a da superfície NT, com valores em torno de  $561,7 \pm 69$  nm para a primeira e  $317,1 \pm 42,7$  nm para a segunda.
- O tratamento alcalino, seguido pelo recobrimento de CaP, aprimora a hidroflicidade das amostras, diminuindo o ângulo de contato da superfície SLA de  $81^\circ$  para  $16^\circ$  após imersão em NaOH e para  $15^\circ$  após conversão química em SCS. O mesmo ocorre na superfície NT, em que o ângulo de contato diminui de  $19^\circ$  para  $11^\circ$  após o tratamento alcalino e posteriormente para  $0^\circ$  após conversão química. Esse comportamento é provocado pela natureza hidrofílica tanto do NaOH quanto do CaP. Além disso, a formação de cristais de NaOH sobre as superfícies aumentou

a rugosidade da amostra SLA de  $561,7 \pm 69$  nm para  $821,7 \pm 131,0$  nm e da amostra NT de  $317,1 \pm 42,7$  nm para  $351,1 \pm 60,3$  nm.

- Os compostos CaP identificados após conversão química em SCS, foram a hidroxiapatita e seus fosfatos precursores, como o octafosfato de cálcio e o fosfato de cálcio amorfo.
- A superfície NT apresentou maior fração de CaP depositada, como evidenciado pela maior concentração dos grupos Ca, P e  $(\text{PO}_4)^{3-}$  sobre ela. Isso demonstra que a topografia e composição química desta superfície NT modificada com CaP podem ser vantajosas para o uso como implante.
- A modificação química das superfícies NT com CaP resultou em amostras viáveis e não tóxicas que mineralizaram rapidamente e apresentaram uma maior diferenciação após 14 dias em comparação com as superfícies NT e SLA. Isso sugere que essa modificação se configura como uma abordagem eficaz para aumentar a bioatividade dessas superfícies.
- O ranelato de estrôncio sobre a superfície NT promoveu uma melhoria na hidrofobicidade, diminuindo o ângulo de contato de  $19,9^\circ$  em amostras não tratadas para  $8,7^\circ$  após a imersão em RSr. Além disso, também ocorreu a diminuição do ângulo de contato de  $35,3^\circ$  para  $15,4^\circ$  em amostras tratadas somente com CaP e as imersas em mistura CaP + RSr, respectivamente; resultando em um aumento na molhabilidade da superfície pela água.
- O processo de anodização realizado neste estudo não afetou as propriedades térmicas do Ti, preservando sua capacidade de dissipação de calor.
- Apesar das maiores medidas de ângulo de contato associadas à melhor viabilidade celular, é evidente que a química de superfície desempenha um papel primário.



- A análise biológica das amostras NT depositadas com CaP, RSr e a combinação CaP + RSr demonstrou a não toxicidade dessas amostras, que atingiram viabilidade acima de 280 % em relação aos 140 % da superfície NT não tratada em 24 horas de cultura. Ademais, em 48 horas, as amostras depositadas atingiram o valor aproximado de 300 % em relação a 90 % da NT não funcionalizada, demonstrando uma notável melhoria na viabilidade celular
- A ação do RSr se destacou na diferenciação celular ao atingir valor aproximado de 165 %, sendo este superior não somente ao da superfície NT não tratada (120 %), mas também aos valores das superfícies NT / CaP (115 %) e NT / CaP + RSr (115 %), em apenas três dias de cultura, demonstrando superior desempenho da superfície modificada.
- Todas as superfícies funcionalizadas foram capazes de acelerar a mineralização, mostrando valores muito superiores em relação à superfície NT (120 %) e ao grupo controle (120 %) aos 14 dias de cultura. Ainda em relação à deposição mineral, destacou-se em primeiro lugar a superfície recoberta com CaP (825 %), em segundo lugar com a mistura CaP + RSr (630 %) e em terceiro a superfície RSr (375 %).
- A funcionalização da superfície NT de Ti com CaP e RSr é uma abordagem promissora para melhorar a sua osseointegração.
- A concentração de RSr pode ser ajustada para a mistura CaP + RSr, visto os benefícios do composto para a diferenciação.

## 6.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como sugestões para trabalhos futuros é possível citar:

- Testar diferentes ajustes na mistura de CaP + RSr, aumentando a quantidade de ranelato de estrôncio, devido aos seus benefícios na diferenciação celular. De acordo com relatos da literatura, os receptores de células precursoras e células diferenciadas em osteoblastos geralmente preferem o cálcio, entretanto a ativação pelo estrôncio apresenta maiores benefícios.
- Realizar ensaios de liberação controlada em todas as superfícies funcionalizadas.
- Investigar novas rotas de funcionalização, e/ou aprimorar a existente a fim de diminuir o tempo de deposição.
- Realizar as funcionalizações propostas neste trabalho em nanotubos de diâmetros menores, a fim de melhor verificar o efeito da nanotopografia da superfície frente às modificações químicas.
- Conduzir ensaios de corrosão em saliva artificial de Fusayama.
- Realizar ensaios *in vivo* das superfícies funcionalizadas.