

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

**LETÍCIA CHRISTINA MUNIZ BEMBEN**

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE IMPLANTES DE TITÂNIO  
ATRAVÉS DE UMA TÉCNICA HÍBRIDA DE OXIDAÇÃO POR  
PLASMA ELETROLÍTICO E DEPOSIÇÃO DE BIOVIDROS**

**CURITIBA  
Julho – 2019**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

**LETÍCIA CHRISTINA MUNIZ BEMBEN**

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE IMPLANTES DE TITÂNIO  
ATRAVÉS DE UMA TÉCNICA HÍBRIDA DE OXIDAÇÃO POR  
PLASMA ELETROLÍTICO E DEPOSIÇÃO DE BIOVIDROS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Mecânica, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Escola Politécnica, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo C. Soares Jr.**

**CURITIBA  
Julho – 2019**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Edilene de Oliveira dos Santos CRB - 9/1636

B455m  
2019 Bemben, Leticia Christina Muniz  
Modificação superficial de implantes de titânio através de uma técnica híbrida de oxidação por plasma eletrolítico e deposição de biovidros / Leticia Christina Muniz Bemben ; orientador, Paulo C. Soares Jr. -- 2019  
59 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2019  
Bibliografia: f. 52-59

1. Engenharia mecânica. 2. Próteses e implantes. 3. Titânio. 4. Oxidação. 5. Osseointegração. I. Soares Junior, Paulo César.  
III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. IV. Título.

CDD 20. ed. – 620.1

## TERMO DE APROVAÇÃO

**Letícia Christina Muniz Bembem**

### **Modificação Superficial de Implantes de Titânio Através de uma Técnica Híbrida de Oxidação por Plasma Eletrolítico e Deposição de Biovidros**

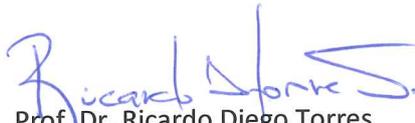
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Mestrado em Engenharia Mecânica, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, da Escola Politécnica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



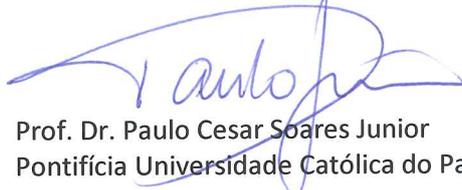
Prof. Dr. Gelson Biscaia de Souza  
Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG



Prof.ª Dr.ª Selene Elifio-Espósito  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR



Prof. Dr. Ricardo Diego Torres  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR



Prof. Dr. Paulo Cesar Soares Junior  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Orientador

Curitiba, 05 de julho de 2019



Dedico este trabalho ao meu pai Ilson Bembem  
(*In Memoriam*) e a minha mãe Adriana Zeni por  
toda confiança e amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Adriana Zeni e a minha avó Suely Zeni pelo amor incondicional, confiança, incentivo e apoio.

Ao meu orientador Prof. Paulo César Soares Jr., pelos ensinamentos, incentivos e apoio durante a realização desse trabalho.

Ao professor Ketul C. Popat por me receber e orientar durante a realização dos ensaios na CSU.

Aos professores Ricardo D. Torres, Carlos A. H. Laurindo e César A. Neitzke pelo suporte e apoio.

A professora e amiga Denise Weiss, pelo auxílio e apoio.

A todos os professores e funcionários envolvidos no programa de pós-graduação da PUC-PR, em especial ao professor Fred Lacerda Amorim e à Jane Rocha.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte do desenvolvimento desse trabalho.

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

## RESUMO

A interface entre a superfície do implante e o tecido ósseo desempenha um papel crítico na estabilidade e no sucesso do implante. Diversas técnicas de modificação da superfície do titânio vêm sendo propostas e implementadas comercialmente, sendo as mais comuns o jateamento combinado ao ataque ácido, a oxidação eletrolítica a plasma (*Plasma Electrolytic Oxidation, PEO*), e a deposição de biocerâmicas (principalmente a hidroxiapatita) por *plasma spray*. Entretanto, a técnica de *plasma spray* tem algumas desvantagens devido à alta temperatura envolvida neste processo, a qual altera a estrutura da HAp, e além disso, a camada depositada é heterogênea, com muitos defeitos, podendo ocasionar o deslocamento da HAp. O objetivo deste trabalho foi produzir uma superfície modificada no titânio, combinando a técnica de PEO, que resulta em uma camada de óxido porosa e bem aderida ao substrato, com a incorporação mecânica de biocerâmicas dentro desses poros e avaliar a adesão dessas partículas após um ensaio de inserção, e a bioatividade. As partículas biocerâmicas testadas foram dois materiais bastante utilizados comercialmente, a hidroxiapatita e o Bioglass 45S5®, e um biovidro experimental à base de fosfato de cálcio (*PBG – Phosphate Based Glass*). Amostras de titânio grau 4 foram previamente lixadas e limpas ultrassonicamente, e anodizadas para a produção da camada porosa de TiO<sub>2</sub>. Em seguida, partículas do PBG, HAp e Bioglass foram incorporadas à camada porosa através de deposição mecânica. A adesão e manutenção dessas partículas foram caracterizadas pela inserção do implante em poliuretano de alta densidade e posterior avaliação em MEV. A bioatividade foi testada através de ensaios com cultura de células. Foram utilizadas células tronco de tecido adiposo (ADSC) e foi avaliada a citotoxicidade, adesão, proliferação e a diferenciação celular. Os resultados mostraram que a combinação da superfície de óxido porosa com a incorporação de partículas de biocerâmicas produziram uma superfície bioativa, e que as partículas permanecem aderidas ao implante após a sua inserção. Os resultados de células mostraram que a incorporação das partículas biocerâmicas promovem uma melhor resposta de viabilidade celular e um alto crescimento na diferenciação em células ósseas, comparado ao titânio sem tratamento e somente com a superfície PEO. Dentre as partículas biocerâmicas, o Bioglass 45S5 é o que apresenta o melhor resultado para tempos curtos de ensaio, e o vidro PBG o que apresenta o melhor resultado de diferenciação celular para tempos longos. Concluímos que a combinação de técnicas de PEO e deposição mecânica utilizando vidro à base de fosfato fornece uma superfície ideal para implantes dentários e ortopédicos.

Palavras-chave: Titânio, biovidro, oxidação anódica, bioatividade, ADSC

## ABSTRACT

The interface between the implant surface and the bone tissue plays a critical role in the stability and success of the implant. Several techniques for modifying the surface of titanium have been proposed and implemented commercially, being the most common blasting combined with acid etching, plasma electrolytic oxidation (PEO), and the deposition of bioceramics (mainly hydroxyapatite) by plasma spray. However, the plasma spray technique has some disadvantages due to the high temperature involved in this process. The structure of HAp changes, and in addition, the deposited layer is heterogeneous, with many defects which can lead to displacement of HAp. The objective of this work was to produce a modified titanium surface, combining the PEO technique, which results in a porous oxide layer and well adhered to the substrate, with the mechanical incorporation of bioceramics, within these pores and evaluate the adhesion of these particles after an insertion assay, and bioactivity properties. The bioceramic particles tested were two commercially widely used materials, hydroxyapatite and Bioglass 45S5®, and an experimental absorbable phosphate based glass (PBG) bioglass. Grade 4 titanium samples were previously sanded and ultrasonically cleaned and anodized for the porous TiO<sub>2</sub> layer. Thereafter, PBG, HAp and Bioglass® particles were incorporated into the porous layer by mechanical deposition. The adhesion and maintenance of these particles was characterized by the insertion of the implant in high density polyurethane and subsequent evaluation in SEM. Bioavailability was assessed by cell culture assays. Adipose tissue stem cells (ADSC) were used and cytotoxicity, adhesion, proliferation and cell differentiation were evaluated. The results showed that the combination of the porous oxide surface with the insertion of bioceramic particles produced a bioactive surface, and that the bioactive particles remain adhered to the implant after its insertion. The cell results showed that the incorporation of the bioceramic particles promoted a better cell viability response and a high growth in the differentiation in bone cells, compared to the titanium without treatment and only with the PEO surface. Among the bioceramic particles, the Bioglass 45S5 is the one that presents the best result for short test periods, and the PBG glass, which presents the best result of cell differentiation for long times. We conclude that the combination of PEO techniques and mechanical deposition using phosphate glass provides an ideal surface for dental and orthopedic implants.

Keywords: Titanium, bioglass, PEO, bioactivity, ADSC.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de um implante endósseo (< <a href="https://senseodonto.com.br/implante-dentario/">https://senseodonto.com.br/implante-dentario/</a> > acesso em: 28/04/19). .....	14
Figura 2. Esquema representando a interação dos grupos de biomateriais com o organismo humano a) biomaterial bioinerte b) e c) biomateriais bioativos e d) biomateriais bioabsorvíveis (Heness e Nissan, 2004).....	15
Figura 3. Diagrama esquemático da célula eletroquímica para realizar PEO.....	17
Figura 4. Imagem esquemática da formação de poros no óxido de TiO <sub>2</sub> pelo processo de PEO (Shin <i>et al.</i> , 2011). .....	18
Figura 5. Desenho esquemático da técnica de revestimento por Plasma Spray (Adaptado de < <a href="https://www.ofic.co.jp/en/r_and_d/thermalspraying/">https://www.ofic.co.jp/en/r_and_d/thermalspraying/</a> > Acesso: 21/03) .....	19
Figura 6. Diagrama da formação de HAp em torno da partícula do Biovidro. (Adaptado de < <a href="https://ryortho.com/2014/10/bioglass-is-back-in-an-incredible-new-form/">https://ryortho.com/2014/10/bioglass-is-back-in-an-incredible-new-form/</a> > Acesso:21/03/19) .....	21
Figura 7 Processo da interação da interface material/corpo humano. a) camada de água; b) adsorção de proteínas na superfície do implante; c) atração, adesão e proliferação de células mesenquimais; d) diferenciação em osteoblastos e formação do tecido ósseo (Tagaya et al, 2012).....	22
Figura 8. Fluxograma que representa a sequência dos procedimentos utilizados na metodologia desse trabalho. ....	25
Figura 9. A) Esquema da Célula eletroquímica B) Célula eletroquímica utilizada na oxidação dos discos de Ti.....	26
Figura 10. Célula eletroquímica utilizada na oxidação dos implantes dentários. ....	27
Figura 11. Tamanho médio das partículas de cada grupo de biocerâmicas. ....	28
Figura 12. A) C) E) Imagens de MEV das partículas de cada grupo de biocerâmicas e B) D) F) Análise química por EDS das partículas de cada grupo. Sendo A) e B) HAp, C) e D) 45S5 e E) e F) PBG. A escala corresponde a 5 µm. ....	28
Figura 13. Esquema da deposição das biocerâmicas sob a superfície obtida através do PEO antes e após inserção no osso.....	29
Figura 14. Inserção do implante com superfície modificada no osso sintético - Sawbones.....	30
Figura 15. Osso sintético cortado ao meio, após a inserção no implante, para análise no MEV.....	30
Figura 16. A) Imagem de MEV da superfície do óxido de TiO <sub>2</sub> obtida após o PEO. A escala corresponde a 20 µm; B) Análise química através de EDS da superfície de óxido de TiO <sub>2</sub> , obtida após PEO. ....	36
Figura 17. Imagem de MEV da superfície após deposição das partículas de biocerâmicas. A) HAp; B) Biovidro 45S5 e C) PBG. A escala corresponde a 5 µm. ....	36

<b>Figura 18. Imagens de MEV dos implantes A) e B) antes da inserção, C) depois da inserção no poliuretano. A escala corresponde a A) 2 mm B) e C) 1 mm. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 19. Imagens de MEV para verificar a permanência das partículas dentro dos poros antes e após a inserção no poliuretano, com o respectivo EDS após a inserção. A) e B) Titânio usinado; C) e D) HAp; E) e F) 45S5 e G) e H) PBG. A escala corresponde a 1 µm.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 20. Gráfico que mostra o resultado da análise de ICP da dissolução do biovidro PBG em meio de cultivo celular. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 21. Gráfico que mostra o resultado da análise de ICP da dissolução de HAp em meio de cultivo celular.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 22. Gráfico que mostra o resultado da análise de ICP da dissolução do biovidro 45S5 em meio de cultivo celular. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 23. Gráfico da dissolução do biovidro 45S5 e do PBG em solução TRIS+HCL. ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 24. Gráfico do resultado da viabilidade celular feito através da redução de CellTiterBlue. Análise estatística representada por (**) <math>p &lt; 0,01</math> e (***) <math>p &lt; 0,001</math>. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 25 Gráfico do número de células presentes nas superfícies dos grupos, no dia 4 e 7 de cultivo celular. Análise estatística representada por (**) <math>p &lt; 0,01</math> e (***) <math>p &lt; 0,001</math>.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 26 Imagens de MEV das superfícies após cultivo celular em 4 e 7 dias.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 27 Imagens de MEV das superfícies durante a diferenciação celular em 1 e 3 semanas. A escala corresponde a 20 µm.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 28. Gráfico que representa a quantidade de Fosfatase Alcalina nas superfícies, durante a semana 1 e semana 3 da diferenciação celular. Diferença estatística representada por (*) <math>p &lt; 0,05</math>. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 29. Imagens do Microscópio de Fluorescência durante a semana 1 e semana 3 da diferenciação celular. Ampliação 10x e escala 60 µm. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 30. Gráfico que mostra a área de Osteocalcina normalizada pelo número de células em cada superfície, durante a diferenciação celular em 1 e 3 semanas. Diferença estatística representada por (*) <math>p &lt; 0,05</math>, (**) <math>p &lt; 0,01</math> e (***) <math>p &lt; 0,001</math>. ....</b>	<b>49</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ADSC	<i>Adipose Derived Stem Cells</i>
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
EDS	<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
HAp	Hidroxiapatita
HMDS	Hexametildisilazano
ICP	<i>Inductive Coupled Plasma Spectroscopy</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
PBG	<i>Phosphate Based Glass</i>
Pcf	<i>Pound per cubic ft</i>
PEO	<i>Plasma Electrolytic Oxidation</i>
PU	Poliuretano
SBF	Simulated Body Fluid

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 OBJETIVOS .....	13
1.1.1 Objetivo Geral .....	13
1.1.2 Objetivos Específicos .....	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1 BIOMATERIAIS .....	14
2.2 TITÂNIO EM IMPLANTES .....	15
2.3 MODIFICAÇÕES DE SUPERFÍCIES .....	16
2.3.1 Oxidação Eletrolítica a Plasma .....	16
2.3.2 Deposição de Hidroxiapatita/Biocerâmicas .....	19
2.4 BIOVIDRO .....	20
2.4.1 Biovidro a base de fosfato de cálcio .....	21
2.5 RESPOSTA BIOLÓGICA E INTERAÇÃO IMPLANTE/ORGANISMO .....	22
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	25
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	25
3.2 OXIDAÇÃO POR PLASMA ELETROLÍTICO .....	26
3.3 DEPOSIÇÃO DE BIOCERÂMICAS .....	27
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES PRODUZIDAS .....	29
3.4.1 Morfologia e Composição Química .....	29
3.4.2 Adesão das partículas .....	29
3.4.3 Dissolução das biocerâmicas .....	31
3.5 CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE .....	31
3.5.1 Viabilidade Celular .....	32
3.5.2 Proliferação Celular .....	32
3.5.3 Interação Célula/Biomaterial .....	33
3.5.4 Diferenciação Celular .....	33

4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES PRODUZIDAS.....	35
4.1.1	Morfologia e Composição Química .....	35
4.1.2	Adesão das partículas biocerâmicas .....	36
4.1.3	Dissolução .....	38
4.2	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA.....	41
4.2.1	Viabilidade e Proliferação Celular .....	41
4.2.2	Interação Célula/Superfície .....	43
4.2.3	Diferenciação Celular .....	46
5.	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
6.	<b>SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>51</b>
7.	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O titânio e suas ligas são os biomateriais metálicos mais utilizados para implantes dentários e ortopédicos, devido às suas excelentes propriedades mecânicas, de resistência à corrosão e sua alta biocompatibilidade (Li *et al.*, 2004; Geetha *et al.*, 2009).

A razão que leva o Titânio a possuir maior biocompatibilidade quando comparado a outros materiais metálicos, é a formação espontânea de uma camada amorfa de óxido quando em contato com meios ricos em oxigênio (Catledge, 2002).

A camada de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) também pode ser obtida artificialmente, através de diferentes métodos de modificação superficial, entre eles o processo de oxidação por plasma eletrolítico (PEO) que produz uma camada porosa de óxido bem aderida sobre a superfície do material (Gupta *et al.*, 2007; Das, K., 2008). Além disso, essa técnica torna possível alterar a composição da camada durante sua formação, incorporando elementos capazes de aumentar a velocidade do processo de osseointegração (Kung *et al.*, 2010; Hussein e Northwood, 2014).

Outro método de modificação de superfície comumente utilizado para melhorar a osseointegração de implantes metálicos é a deposição de hidroxiapatita (HAp) ou vidros bioativos. A hidroxiapatita possui composição química semelhante ao tecido ósseo, tornando-a excelente em bioatividade. O biovidro mais utilizado comercialmente é o 45S5 (45 wt% SiO<sub>2</sub>, 24,5 wt% CaO, 24,5 wt% Na<sub>2</sub>O, and 6,0 wt% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), conhecido como Bioglass® (Knowles *et al.*, 2001). Esses materiais cerâmicos são depositados através de diferentes técnicas na superfície do substrato metálico. Entre as técnicas mais utilizadas comercialmente estão o plasma *spray*, além da deposição eletroforética, sol-gel e deposição eletroquímica (Park, 2007).

No entanto, o uso clínico dos revestimentos depositados por plasma *spray* são limitados por apresentarem uma grande diferença de propriedades mecânicas com relação ao substrato metálico. Isso ocasiona falhas na interface titânio-HAp ou titânio-biovidro, trazendo problemas de baixa adesão e alto risco de delaminação do revestimento, gerando instabilidade e conseqüente baixa vida útil do implante (Catledge, 2002).

Além disso, quando analisamos o revestimento comercial (deposição de partículas de HAp por *plasma spray*) encontramos outros problemas limitantes do seu uso a médio e longo prazo (Ong *et al.*, 2000). Devido à alta temperatura envolvida no processo, a estrutura inicial de algumas partículas de HAp se modifica, tornando possível encontrar partículas amorfas e cristalinas em um mesmo revestimento. A falta de homogeneidade

altera as propriedades de dissolução do material, tornando-a desigual e aumentando ainda mais o risco de deslocamento de parte do revestimento (Iamoni *et al.*, 1999).

A fim de evitar as desvantagens desse tipo de revestimento, desenvolvemos um método que combina a técnica de PEO com a deposição de materiais cerâmicos bioativos. Neste estudo, utilizamos a HAp que é o material cerâmico mais utilizado para recobrimento de materiais metálicos atualmente, um vidro bioativo comercial – o 45S5, e propomos o uso de biovidro à base de fosfato de cálcio, desenvolvido em trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa (Weiss *et al.*, 2014). São vidros que podem se dissolver em dias ou semanas, liberando íons de cálcio, fósforo e estrôncio, atraindo células ósseas que aceleram o processo de osseointegração (Best *et al.*, 2009).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi produzir um revestimento bioativo, combinando as técnicas de oxidação por plasma eletrolítico e a deposição mecânica das biocerâmicas: HAp, Bioglass® 45S5 e biovidro a base de fosfato de cálcio.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a permanência das partículas das biocerâmicas inseridas nos poros de óxido de  $\text{TiO}_2$ , após o teste de inserção em poliuretano;
- b) Avaliar a dissolução dos biovidros incorporados na camada de óxido de titânio;
- c) Avaliar a bioatividade das superfícies através de ensaios de viabilidade, proliferação, adesão e diferenciação celular, utilizando células tronco derivadas de tecido adiposo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são aqueles utilizados na área da saúde com objetivo de dar suporte temporário ou substituir tecidos, órgãos ou funções do corpo humano visando a melhor adequação e menor rejeição do organismo (National Institutes of Health, 1982).

Esses materiais podem ser metálicos, cerâmicos ou poliméricos, de acordo com sua aplicação. Os biomateriais metálicos são bastante utilizados em implantes endósseos que exigem resistência a elevadas cargas mecânicas, como próteses dentárias, ou ortopédicas (Figura 1) (Ratner, 2004).



Figura 1. Ilustração de um implante endósseo (<<https://senseodonto.com.br/implante-dentario/>> acesso em: 28/04/19).

Os biomateriais são classificados em três grandes classes quanto à sua interação com o organismo humano: bioinertes, bioativos ou bio-absorvíveis (Figura 2) (Heness e Nissan, 2004).

- Materiais bioinertes são aqueles que possuem a mínima interação possível com o organismo (Figura 2a); geralmente ocorre a formação de um tecido fibroso ao seu redor, fazendo com que o corpo humano não expulse e nem interaja com o material;
- Materiais bioativos (Figura 2b e 2c) possuem uma maior interação com o organismo, os quais favorecem e auxiliam no crescimento do tecido circundante;
- Materiais bioabsorvíveis (Figura 2d) são materiais que, após a sua colocação no interior do corpo humano, começam a se dissolver e a ser lentamente substituído pela formação do novo tecido (Heness e Nissan, 2004).

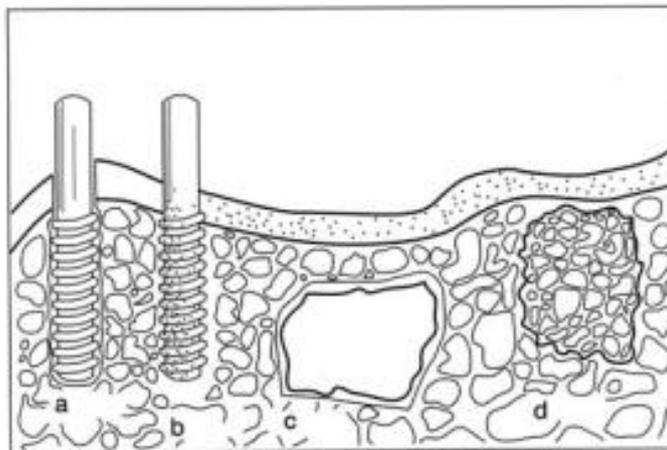


Figura 2. Esquema representando a interação dos grupos de biomateriais com o organismo humano: a) biomaterial bioinerte, b) e c) biomateriais bioativos e d) biomateriais bioabsorvíveis (Heness e Nissan, 2004).

## 2.2 TITÂNIO EM IMPLANTES

O titânio e suas ligas são os materiais mais utilizados na indústria dos biomateriais, devido às suas excelentes propriedades mecânicas, elevada resistência à corrosão e biocompatibilidade (Li *et al.*, 2004; Geetha *et al.*, 2009).

Além disso, o principal diferencial do titânio quando comparado a outros materiais metálicos é a formação espontânea de uma camada passiva de óxido, quando em contato com o ar atmosférico e sua rápida capacidade de repassivação quando em contato com ambiente corrosivo (Cheng *et al.*, 2006).

A presença dessa camada passiva de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) explica as excelentes propriedades biológicas que esse material possui (Shih *et al.*, 2007). Apesar disso, ele é um material bioinerte, ou seja, não possui rápida integração com o tecido ósseo, o que resulta no desenvolvimento de um tecido fibroso ao redor do implante, levando ao seu isolamento e consequente afrouxamento (Das *et al.*, 2008).

Um dos principais fatores ligados ao sucesso clínico do implante é a qualidade e a velocidade do processo de osseointegração. A osseointegração está ligada ao comportamento da interface entre a superfície do implante e do tecido ósseo e para isso é necessária uma superfície bioativa (Brunette, 2012).

Para melhorar a osseointegração, e criar uma interface que evite esse afrouxamento, é necessário favorecer o crescimento das células ósseas na superfície do implante (Liu *et*

*al.*, 2004). Para isso são utilizadas técnicas de modificações superficiais (Chu *et al.*, 2009).

## 2.3 TÉCNICAS DE MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIES

Diferentes técnicas de modificação de superfície foram desenvolvidas para melhorar a composição química, a morfologia, a topografia e a rugosidade dos implantes metálicos, sempre visando melhorar a velocidade e a qualidade do processo de osseointegração (Upp *et al.*, 2006).

Dentre essas técnicas, destacam-se o jateamento combinado com ataque ácido, oxidação eletrolítica à plasma (PEO) e revestimentos cerâmicos em substratos metálicos, como HAp por plasma *spray* (Pardo *et al.*, 2009, Shrestha, 2010, Hornberger *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Oxidação Eletrolítica a Plasma

A camada de óxido de titânio pode ser obtida artificialmente através de várias técnicas de modificação superficial, entre elas a Oxidação Eletrolítica a Plasma (PEO) (Yerokin, 1999).

Essa técnica, também conhecida como oxidação por micro-arco, é considerada uma das melhores técnicas de modificação superficial, pois produz uma camada porosa bem aderida à superfície do titânio (Li *et al.*, 2004).

Durante o processo de anodização, ocorre a formação de uma camada interna compacta e densa sob a camada porosa externa, diminuindo o risco de deslocamento (Suminov, 2005; Goueffon *et al.*, 2009; Walsh, 2009). Estudos anteriores realizados em nosso grupo comprovam a resistência a tribocorrosão (desgaste associado à corrosão) da camada de TiO<sub>2</sub> obtida através do PEO sobre o substrato de titânio (Laurindo *et al.*, 2017).

Essa camada melhora não só a resistência à corrosão e ao desgaste, como também melhora as propriedades de integração do material com o tecido ósseo (Li *et al.*, 2004). A presença dos poros leva ao aumento da rugosidade da superfície, fazendo com que as células tenham maior capacidade de adesão (Elias *et al.*, 2007). Além disso, durante o processo, é possível alterar a composição da camada, incorporando elementos, como Ca e P, capazes de aumentar a velocidade do processo de osseointegração (Kung, 2010).

### 2.3.1.1 Obtenção da camada de TiO<sub>2</sub>

A técnica de PEO consiste em uma oxidação anódica, composta por uma célula eletroquímica que possui eletrodo de trabalho, contra-eletrodo, eletrólito e fonte de tensão, como mostra a figura 3. Aplicando uma diferença de potencial no sistema, através da fonte elétrica, temos o eletrodo de trabalho ligado ao polo positivo (cátodo) e o contra eletrodo ao polo negativo (ânodo). A partir disso ocorre uma reação de oxirredução: a superfície do ânodo é oxidada enquanto a superfície do cátodo é reduzida, levando ao crescimento da camada de óxido na superfície do titânio (Yerokhin *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004; Santos 2005; Hussein e Northwood, 2014).

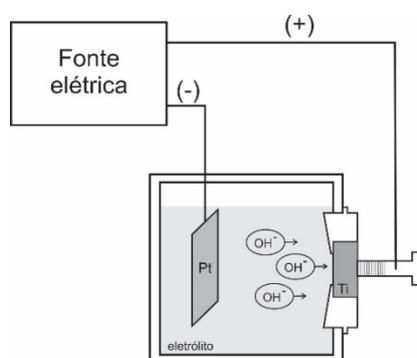


Figura 3. Diagrama esquemático da célula eletroquímica para realizar PEO.

Existem dois métodos pelos quais a técnica de PEO pode ser realizada. O método potencioestático, no qual é aplicada uma tensão constante ao processo, e o método galvanostático, no qual é aplicado um valor constante para a densidade de corrente (Liu *et al.*, 2006).

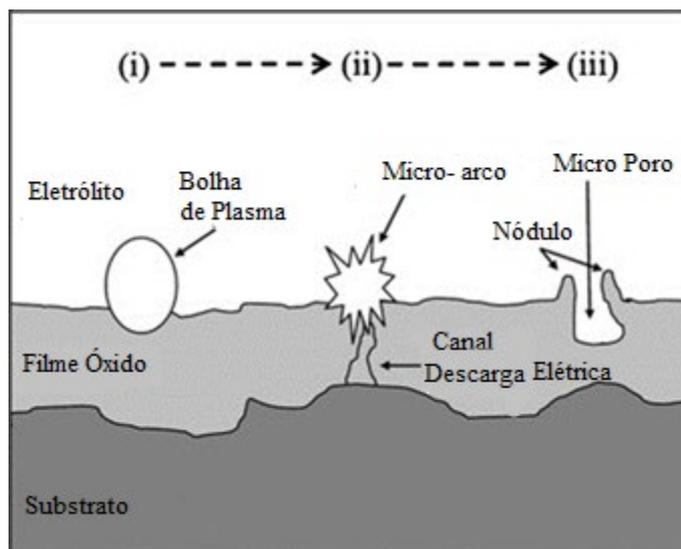


Figura 4. Imagem esquemática da formação de poros no óxido de  $\text{TiO}_2$  pelo processo de PEO (Shin *et al.*, 2011).

A camada de óxido se comporta como uma camada isolante sobre o substrato, e quando a diferença de potencial aplicada ao sistema excede um valor crítico, ocorre a ruptura dielétrica da mesma. A ruptura dielétrica dessa camada isolante ocorre na forma de descargas elétricas, como é mostrado na figura 4, gerando a formação de “micro-arcos”, ou seja, canais de plasma, que podem ser observados pela presença de faíscas na superfície do material. A alta temperatura no local dos micro-arcos faz com que a camada de óxido se funda, formando os poros (Yerokhin *et al.*, 1999; Dunleavy *et al.*, 2009; Nominé *et al.*, 2015).

Além da tensão e da densidade de corrente, o processo sofre influência da composição e concentração do eletrólito. A adição de íons de diferentes elementos no eletrólito faz com que estes sejam incorporados e afetem a composição da nova superfície (Diamanti e Pedeferrri, 2007). A incorporação desses elementos ocorre na resolidificação da camada fundida (Nominé *et al.*, 2015; Shokouhfar e Allahkaram 2016).

Muitos estudos usam a adição de íons de cálcio e fósforo na composição do eletrólito, durante o PEO, para que formem uma camada rica em elementos que são presentes no tecido ósseo humano, favorecendo o processo de osseointegração (Zhu *et al.*, 2001, Ishizawa *et al.*, 1995, Laurindo *et al.*, 2014). Também podem ser utilizados íons de boro, prata e zinco para formar uma camada rica em elementos funcionais, como os bactericidas (Sopchenski *et al.*, 2018a; Sopchenski *et al.*, 2018b; Santos *et al.*, 2018).

### 2.3.2 Deposição de Hidroxiapatita/Biocerâmicas

Outro método de modificação superficial usado para melhorar o processo de osseointegração em implantes é revestir metais com hidroxiapatita sintética ou biocerâmicas (Kim *et al.*, 2005). Esses revestimentos formam uma superfície osteocondutora que facilita a ligação do implante com o tecido ósseo (Li *et al.*, 2003).

A matriz óssea é composta de hidroxiapatita e fibras de colágeno. A hidroxiapatita representa cerca de 70% do peso e 50% do volume dessa matriz (Wei *et al.*, 2001). Isso explica sua excelente biocompatibilidade, porém suas propriedades mecânicas não são adequadas para serem usadas como um implante, o que leva serem utilizadas como revestimento em substratos metálicos (Wei *et al.*, 2001).

Além disso, muitos problemas relacionados ao deslocamento deste revestimento são relatados, incluindo falhas na interface titânio-HAp, o que causa problemas de baixa adesão e diminuição da vida útil do implante (Catledge *et al.*, 2002). O deslocamento deste revestimento é justificado pela grande diferença entre propriedades mecânicas da HAp e do material metálico do substrato (Catledge *et al.*, 2002).

Várias técnicas são utilizadas para a deposição desse revestimento, como por *plasma spray*, sol-gel e eletroforese (Park *et al.*, 2007), sendo o mais utilizado comercialmente o revestimento por *plasma spray*. Essa técnica consiste na pulverização do pó de HAp através de um *spray* de plasma em alta temperatura em direção ao substrato metálico (Ergun *et al.*, 2003), como mostrado na figura 5.

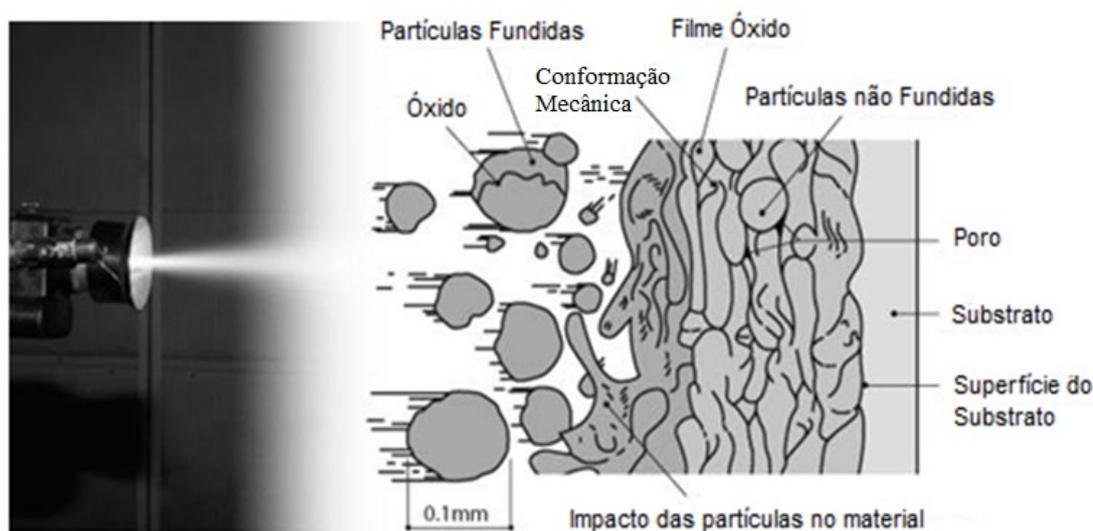


Figura 5. Desenho esquemático da técnica de revestimento por Plasma Spray (Adaptado de [https://www.ofic.co.jp/en/r\\_and\\_d/thermalspraying/](https://www.ofic.co.jp/en/r_and_d/thermalspraying/)) Acesso: 21/03)

A fonte de aquecimento é um arco-elétrico que aquece um gás ou uma mistura de gases até que uma temperatura muito elevada seja atingida, cerca de 8000 °C. Com a expansão do gás, a velocidade da chama do plasma aumenta na direção ao metal. Quando o pó entra em contato com o plasma ele se funde e então começa a ser depositado sob o substrato (Davis *et al.*, 1997).

A nova superfície formada, além de não possuir a adesão necessária, é irregular. Além disso, com as altas temperaturas envolvidas no processo, a HAp se decompõe (Wei *et al.*, 2005). A estrutura inicial de algumas partículas se modifica, formando um revestimento com estruturas cristalinas e amorfas, alterando as propriedades de dissolução do material e tornando-a desigual (Iamoni *et al.*, 1999).

## 2.4 BIOVIDROS

Assim como a HAp, os biovidros são bastante utilizados como biomateriais. Além de sua bioatividade, esses materiais podem ser bioabsorvíveis, ou seja, possuem a capacidade de atuar como implantes temporários no organismo, dando espaço ao crescimento de um novo tecido à medida que se dissolvem.

Porém, assim como a HAp, os biovidros possuem propriedades mecânicas muito diferentes à dos metais quando se trata de tenacidade à fratura, pois são materiais frágeis, tornando seu uso inviável para próteses endósseas (Verne *et al.*, 1999). Isso pode ser resolvido através de sua deposição como revestimento em um substrato metálico (Verne *et al.*, 1999).

Atualmente, o biovidro mais comercializado é o biovidro 45S5, conhecido como Bioglass® (Hench *et al.*, 1991). Ele é composto por 45% (porcentagem em peso) de SiO<sub>2</sub>, 24,5% de CaO, 24,5% de Na<sub>2</sub>O e 6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Best *et al.*, 2009).

Seu grande sucesso clínico se deve à capacidade osteocondutora, ou seja, o material possui a capacidade de se ligar rapidamente ao tecido ósseo, devido à formação de uma camada de HAp ao seu redor, como mostra a figura 6 (Rahaman *et al.*, 2011).

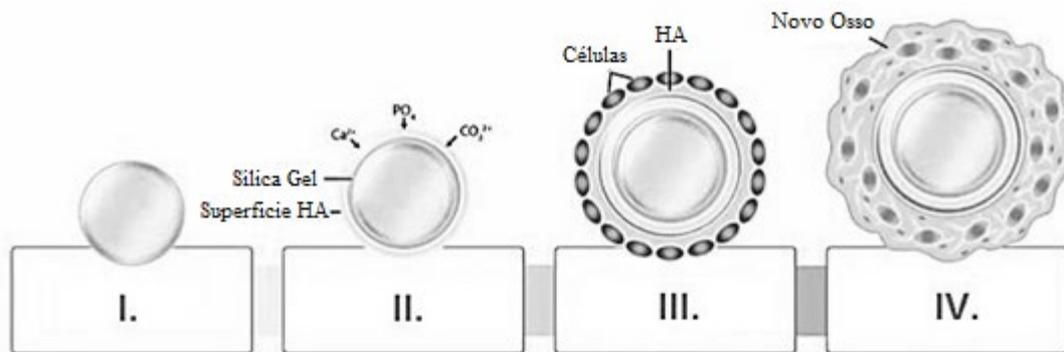


Figura 6. Diagrama da formação de HAp em torno da partícula do Biovidro. (Adaptado de <<https://ryortho.com/2014/10/bioglass-is-back-in-an-incredible-new-form/>> Acesso:21/03/19)

Quando a partícula de biovidro entra em contato com o fluídos corpóreos (I), reações de troca iônica entre íons modificadores de rede de vidro ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}_2^+$ ) com íons  $\text{H}^+$  presentes no meio, promovem a hidrólise da sílica, permitindo a formação de silanol (Si-OH) na superfície do vidro. A ligação de Si-OH atrai e íons de  $\text{Ca}_2^+$  e  $\text{PO}_4^-$  que permitem a formação de uma camada de fosfato de cálcio, a qual se consolida em HAp (II). Os osteoblastos, células formadoras de tecido ósseo, são atraídos para essa camada (III). Com o crescimento e maturação das células, forma-se uma matriz óssea que dá origem ao novo tecido (IV) (Hench *et al.*, 1993, Ostomel *et al.*, 2006, Rahaman *et al.*, 2011, Islam *et al.*, 2017).

#### 2.4.1 Biovidro à base de fosfato de cálcio

Outro grupo de biovidro que vem ganhando muita importância são os biovidros à base de fosfatos. Eles despertaram grande interesse da área de biomateriais e de regeneração de tecidos ósseos por possuir uma composição química semelhante à fase mineral do osso, rica em fósforo e cálcio. Sua principal diferença com o biovidro comercial 45S5 é a capacidade de se dissolver em semanas ou até mesmo em dias, conforme a sua composição (Weiss *et al.*, 2014; Skelton *et al.*, 2007).

Dentro do organismo humano, enquanto ocorre a formação do novo tecido, as partículas do biovidro à base de fosfato de cálcio se dissolvem e liberam íons de cálcio e fósforo no organismo, atraindo células ósseas para a superfície e acelerando a osseointegração (Zhang *et al.*, 2011). Estudos anteriores mostram que esse material

possui ótima bioatividade através de ensaios biológicos (Abou Neel *et al.*, 2014; Weiss *et al.*, 2014).

## 2.5 RESPOSTA BIOLÓGICA E INTERAÇÃO IMPLANTE/ORGANISMO

Logo após a inserção de um implante no corpo humano, ocorre a adsorção de proteínas em sua superfície, ou seja, as proteínas presentes no sangue e em fluidos corpóreos se aderem sobre o implante. Elas formam uma camada que é capaz de interagir e atrair células mesenquimais (células tronco), que posteriormente se diferenciam em células de tecidos circundantes, como é possível observar na figura 7. Conforme a topografia e a composição da superfície do implante, as células mesenquimais podem se diferenciar em células ósseas (osteoblastos), formando um novo tecido ósseo ao seu redor (Mavrogenis *et al.*, 2009).

A primeira proteína encontrada durante a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos é a fosfatase alcalina (Stein *et al.*, 1990). Sua presença indica a proliferação das células ósseas e o começo da formação de um novo tecido. Já na fase de mineralização do tecido, pode-se encontrar três principais proteínas: osteocalcina, osteopontina e osteonectina, sendo a osteocalcina a mais abundante (Grafenau *et al.*, 2000).

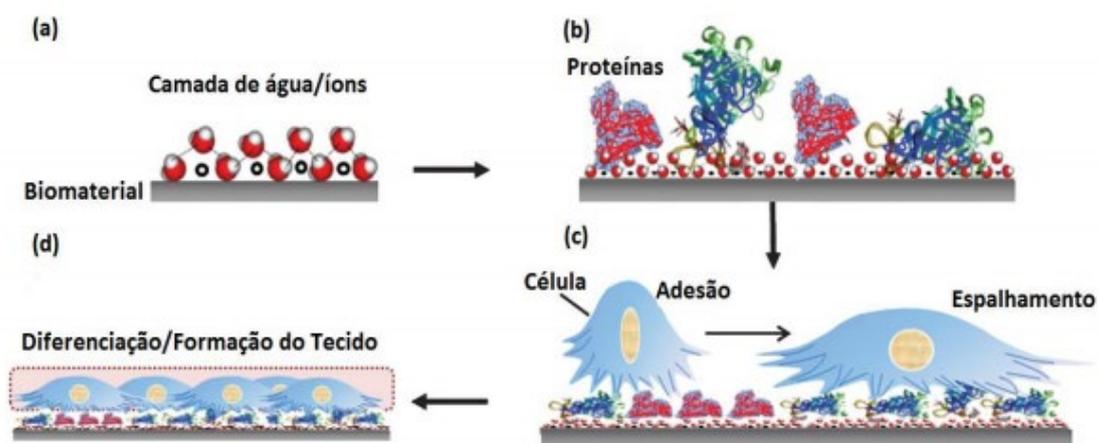


Figura 7 Processo da interação da interface material/corpo humano. a) camada de água; b) adsorção de proteínas na superfície do implante; c) atração, adesão e proliferação de células mesenquimais; d) diferenciação em osteoblastos e formação do tecido ósseo (Tagaya et al, 2012).

Estudos mostram a bioatividade de camadas de óxido de titânio obtidas através do PEO (Ribeiro *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Wu *et al.* (2015) avaliaram as camadas com diferentes concentrações de cálcio no eletrólito, durante o processo de PEO. A bioatividade foi caracterizada utilizando-se células MC3T3-E1 (Osteoblastos) e através de ensaios de morfologia e de diferenciação celular por atividade de fosfatase alcalina. Ribeiro *et al.* (2015) avaliaram camadas de TiO<sub>2</sub> com incorporação de Ca e P, com anodização realizada durante 1 min a 300 V. Os testes biológicos foram realizados com osteoblastos através da citotoxicidade, expressão gênica, imunocitoquímica e avaliação da morfologia celular. Os dois estudos mostram que a superfície obtida por PEO contendo íons de Ca e P, melhora a biocompatibilidade do material, levando a uma rápida adesão e proliferação dos osteoblastos.

Muitos estudos comprovam a bioatividade do Bioglass® 45S5 (Hench *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002; Xynon *et al.*, 2000a; Xynos *et al.*, 2000b). Xynos *et al.* (2000b) utilizou osteoblastos para avaliar a proliferação celular, interação célula/superfície e diferenciação. Xynon *et al.*, (2000a) avaliou a bioatividade através da expressão gênica, e mostram que o material possui ótima biocompatibilidade e que atrai células acelerando sua adesão e proliferação.

A bioatividade de quatro composições diferentes de biovidros à base de fosfato de cálcio, produzidos utilizando-se os elementos NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e TiO<sub>2</sub> foi avaliada com células humanas de osteosarcoma (*Human Osteosarcoma HOS*). Os ensaios de proliferação celular foram feitos através do AlamarBlue®, e diferenciação celular através de testes de expressão gênica, atividade de fosfatase alcalina e concentração de Osteocalcina por absorvância espectrométrica (Abou Neel *et al.*, 2014). Os autores concluíram que os biovidros permitem a viabilidade, adesão e alta proliferação celular, além de promover a diferenciação de células de osteossarcoma.

### 2.5.1 Células ADSC (*Adipose Derived Stem Cells*)

As células-tronco são caracterizadas por sua capacidade de sofrer autorrenovação e de se diferenciar em múltiplas linhas para formar células de diferentes tecidos do corpo humano (Gimble, 2005). Elas podem ser derivadas de órgãos específicos, como cérebro, intestino, pulmão, fígado, tecido adiposo e medula óssea (Wei *et al.*, 2000).

Especificamente, as células-tronco mesenquimais adultas podem ser isoladas da medula óssea ou do tecido adiposo. Com o aumento da incidência de obesidade, o tecido

adiposo subcutâneo é abundante e de fácil acesso, além de ser descartado rotineiramente em processos de lipoaspiração (Bray, 2000). As células-tronco isoladas desse tecido são conhecidas como ADSC (*Adipose Derived Stem Cells*) e são capazes de se diferenciar em células de diversos tecidos, como em células ósseas (Bunnell *et al.*, 2008).

Em estudos *in vitro* realizados com esse tipo de célula, meios de diferenciação específicos são utilizados para cada tipo de células desejado. Pesquisas visando comprovar e avaliar o comportamento de biomateriais capazes de acelerar o processo de osseointegração utilizam células ADSC para avaliar sua diferenciação em células ósseas. Sua diferenciação é avaliada através da análise da atividade de fosfatase alcalina e da produção de osteocalcina (Soares *et al.*, 2018; Trujillo e Popat, 2014; Cowden *et al.*, 2019; Pulyala *et al.*, 2017).

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Esse trabalho foi desenvolvido e realizado seguindo a sequência mostrada pelo fluxograma da figura 8 abaixo.

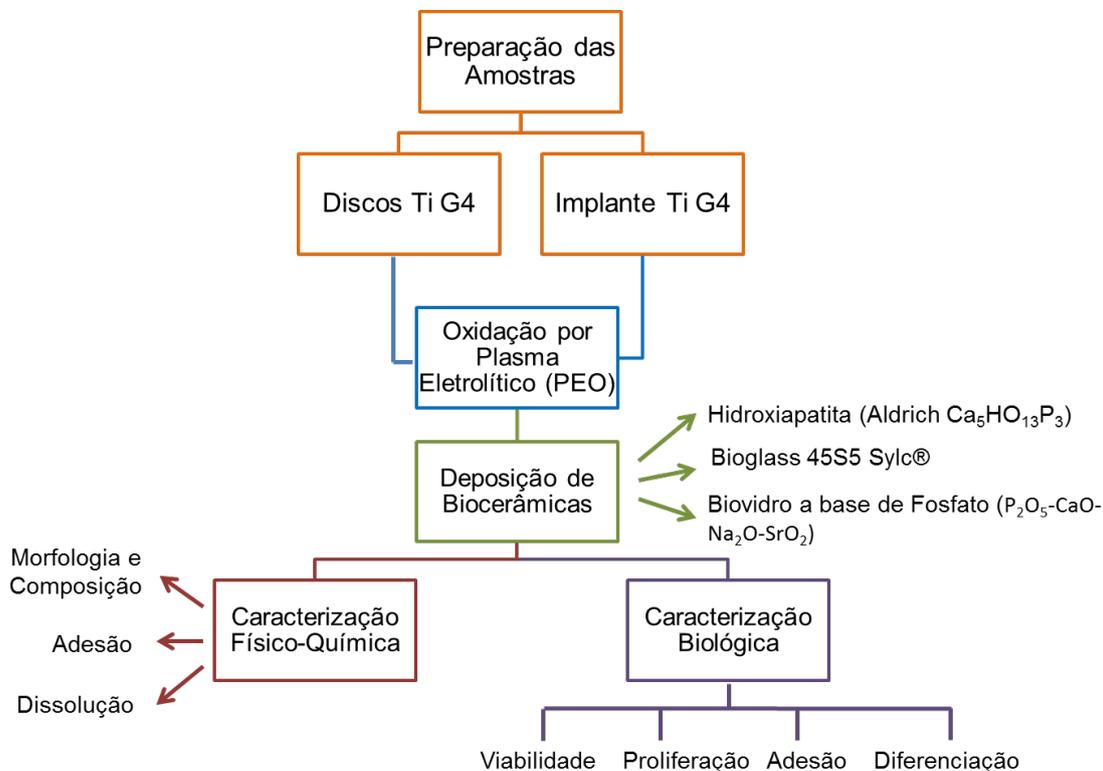


Figura 8. Fluxograma que representa a sequência dos procedimentos utilizados na metodologia desse trabalho.

#### 3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Dois tipos de amostras foram utilizados: Grupo 1 - discos de Titânio Grau 4 (Ti-G4) com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram cortados por eletroerosão a fio e em seguida, lixados com lixas SiC de granulometria de #500 e #800. Depois de lixadas, as amostras foram limpas no ultrassom com acetona, álcool e água deionizada. Grupo 2 - implantes dentários modelo Alvim da Empresa Neodent/SA, fabricados em Titânio Grau 4, sem tratamento de superfície. As amostras do grupo 2 foram utilizadas somente nos ensaios de inserção.

### 3.2 OXIDAÇÃO POR PLASMA ELETROLÍTICO

O processo de oxidação por plasma eletrolítico foi realizado no Laboratório de Caracterização e Ensaio de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LaCEM-PUCPR).

As amostras foram oxidadas pelo método potenciostático. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo avaliaram os parâmetros do PEO e concluíram que para obtenção de uma camada porosa e bem aderida ao substrato, a tensão deveria permanecer constante no valor de 350 V pelo tempo de 60 s. O tamanho médio dos poros da camada é de 2  $\mu\text{m}$  (Laurindo *et al.*, 2017). O eletrólito utilizado foi uma solução aquosa composta por 4,20 g/l de Glicerofosfato de Cálcio e 26,42 g/l de Acetato de Cálcio (Laurindo *et al.*, 2017).

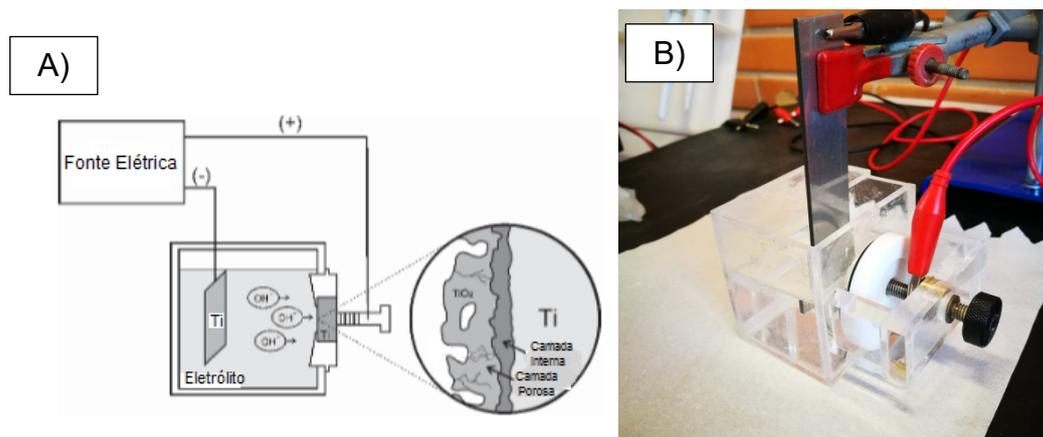


Figura 9. A) Esquema da Célula eletroquímica B) Célula eletroquímica utilizada na oxidação dos discos de Ti.

A célula eletroquímica utilizada para oxidar os discos de Titânio (figura 9) é composta por uma cuba, fonte elétrica de corrente contínua (62012P-600-8/Chroma) e contra-eletródo de titânio. Para a oxidação dos implantes dentários, foi utilizada a mesma fonte elétrica, um Becker e um contra eletródo circular de Titânio (figura 10).



Figura 10. Célula eletroquímica utilizada na oxidação dos implantes dentários.

Após o processo de oxidação, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas em uma estufa a 40 °C, onde foram armazenadas até os ensaios subsequentes.

### 3.3 DEPOSIÇÃO DE BIOCERÂMICAS

Após a realização da oxidação anódica, as amostras foram divididas em três grupos para a deposição das biocerâmicas:

- 1- Hidroxiapatita Sintética (PEO + HAp)
- 2- Bioglass® 45S5 (PEO + 45S5)
- 3- Biovidro a base de fosfato de cálcio (PEO + PBG)

A hidroxiapatita (em nanopartículas) utilizada foi a do fabricante Sigma Aldrich® com composição  $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ ; o Bioglass 45S5 ( $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ ) utilizado foi do fabricante Sylec®; e o biovidro à base de fosfato de cálcio ( $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-SrO}_2$ ) foi desenvolvido no LaCEM-PUCPR com base em estudos anteriores do grupo (Weiss *et al.*, 2014).

As figuras 11 e 12 abaixo mostram o tamanho médio das partículas de cada grupo de biocerâmicas e sua composição química. No grupo 45S5, as medidas foram feitas

somente das menores partículas, pois as maiores ultrapassam o tamanho do poro obtido por PEO e não seriam depositadas dentro dos poros na camada de óxido.

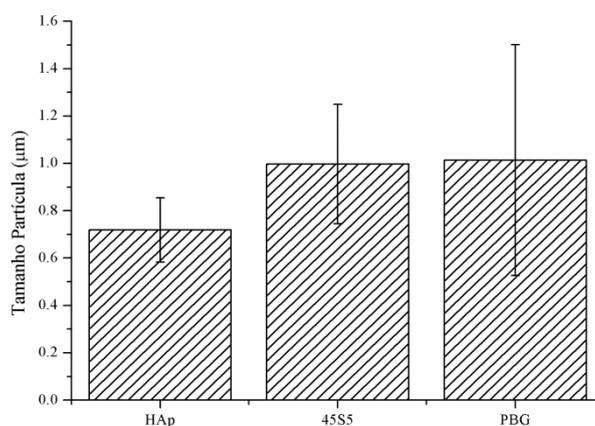


Figura 11. Tamanho médio das partículas de cada grupo de biocerâmicas.

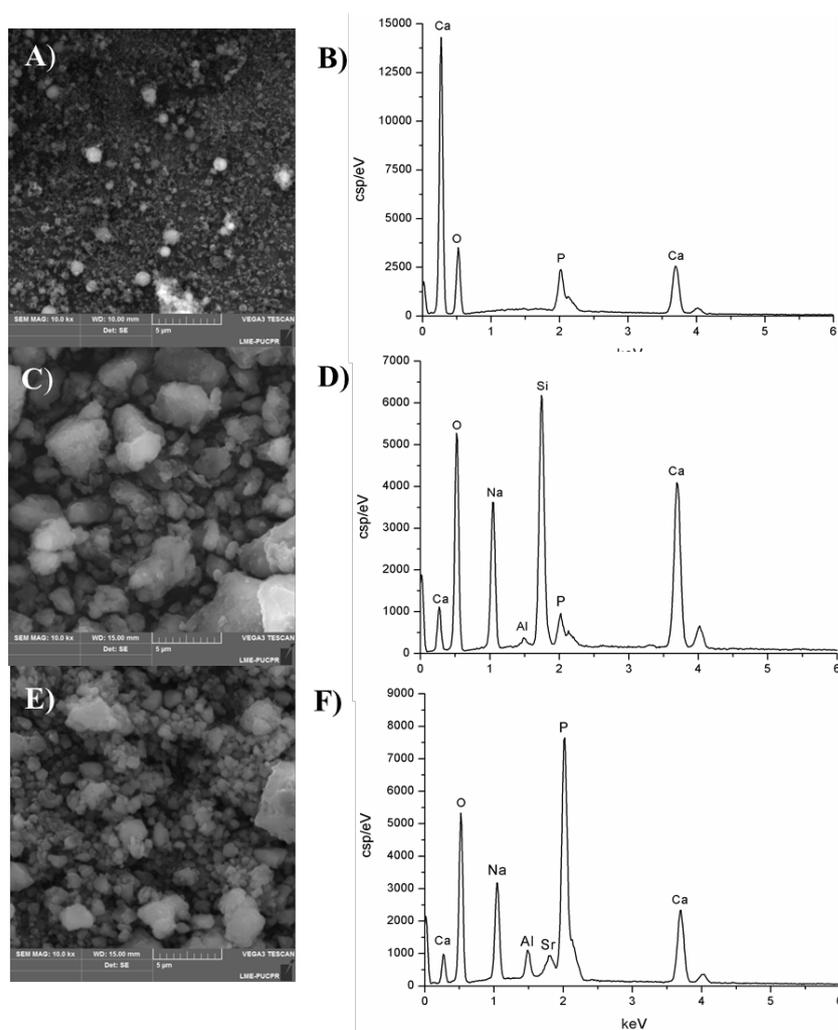


Figura 12. A) C) E) Imagens de MEV das partículas de cada grupo de biocerâmicas e B) D) F) Análise química por EDS das partículas de cada grupo. Sendo A) e B) HAp, C) e D) 45S5 e E) e F) PBG. A escala corresponde a 5 µm.

A incorporação das biocerâmicas foi realizada manualmente, utilizando luva, através da fricção das partículas sobre a superfície oxidada. A intenção é que as partículas penetrem nos poros de  $\text{TiO}_2$ , como mostra a figura 13, para permanecerem protegidas e para que não ocorra seu deslocamento durante o processo de inserção no osso.

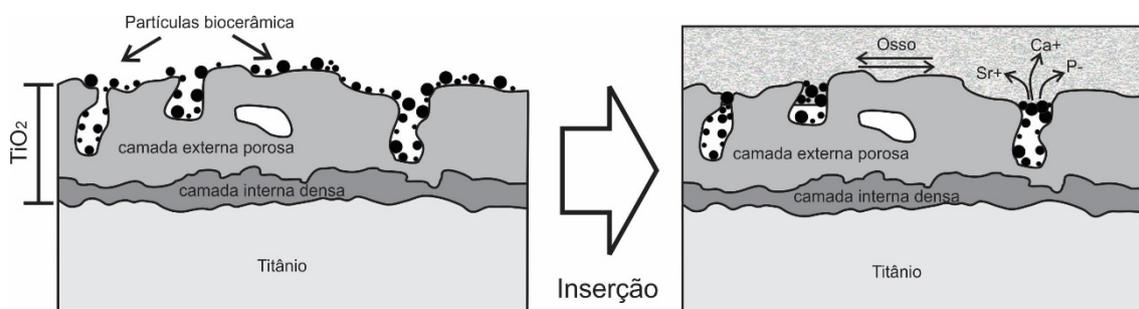


Figura 13. Esquema da deposição das biocerâmicas sob a superfície obtida através do PEO antes e após inserção no osso.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES PRODUZIDAS

#### 3.4.1 Morfologia e Composição Química

A caracterização das amostras quanto à morfologia e composição química da superfície obtida pelo processo de oxidação por plasma eletrolítico e após a deposição das biocerâmicas foi realizada utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, Vega3 – Tescan) e de Espectroscopia de raios X por Dispersão de Energia (EDS, Oxford), localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da PUCPR.

#### 3.4.2 Adesão das partículas

Os testes de adesão das partículas nos poros de  $\text{TiO}_2$  foram realizados utilizando os implantes dentários (Titânio grau 4, modelo Alvim - Neodent) anodizados e com incorporação das partículas. Para simular as condições e esforços sofridos pelo tecido ósseo foi realizada a inserção do implante em um poliuretano de alta densidade (Sawbones 20 Pcf – *Pound per ft* – unidade utilizada para quantificar a densidade do material), com estrutura e densidade similar ao osso do maxilar.

A inserção do implante no poliuretano (figura 14) foi realizada utilizando um torquímetro Neodent, aplicando um torque médio de 40 N.mm, que é o valor utilizado por dentistas durante procedimento cirúrgico.

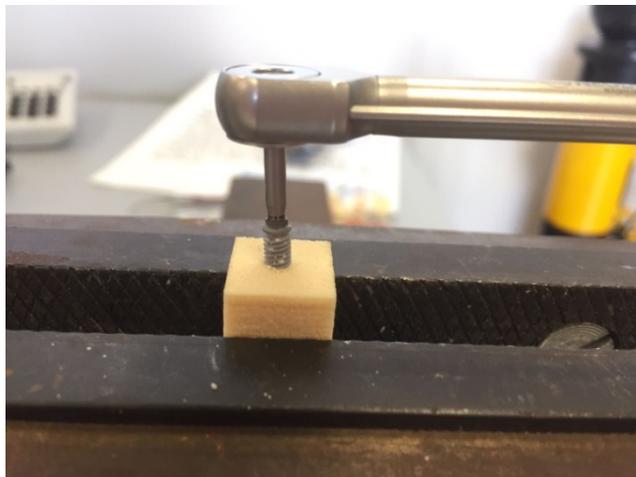


Figura 14. Inserção do implante com superfície modificada no osso sintético - Sawbones.

Para avaliar, após a inserção do implante, se as partículas permaneceram dentro dos poros de  $TiO_2$ , o poliuretano foi cortado transversalmente, conforme mostrado na figura 15, e a análise foi feita utilizando o MEV/EDS. Para comparação, os testes foram realizados nas superfícies dos implantes com e sem a oxidação por plasma eletrolítico.

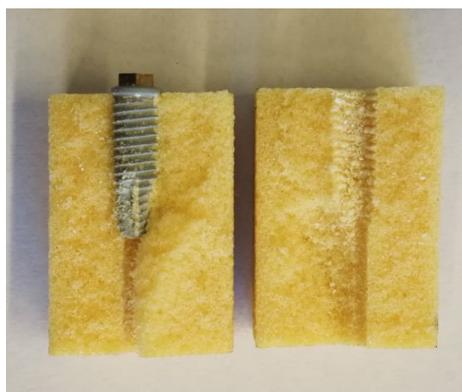


Figura 15. Osso sintético cortado transversalmente, após a inserção no implante, para análise no MEV.

### 3.4.3 Dissolução das biocerâmicas

A dissolução foi feita utilizando a norma ISO 10993-14. Neste ensaio, 0,150 g de cada um dos grupos das biocerâmicas foram colocados em um tubo de ensaio com 30 ml de solução TRIS (hidroximetil)aminometano ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>) + HCl, com pH de 7,4, em um banho-maria à temperatura de 37 °C, em constante movimentação. As amostras, em discos, foram retiradas da solução em 7, 14 e 21 dias e a análise foi feita através da perda de massa, pela equação abaixo.

$$\text{Perda de Massa (\%)} = \frac{(\text{Massa Inicial} - \text{Massa Final})}{\text{Massa Final}} \times 100 \quad (1)$$

As amostras foram pesadas em uma balança (AG200, Gehaka) com precisão de 0,0001 g.

A dissolução das partículas também foi analisada colocando-se os discos de Ti G4 oxidados com as respectivas biocerâmicas em meio de cultivo celular. As amostras foram analisadas após 1, 7 e 14 dias de imersão, por espectrometria de emissão óptica com plasma individualmente acoplado (ICP – PerkinElmer Optima 7300 DV). Esse teste foi realizado no Laboratório de Solos, Águas e Plantas no núcleo de Ciências Naturais e Ambientais na Colorado State University em Fort Collins, CO - EUA.

## 3.5 CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE

Os ensaios de bioatividade *in vitro* foram realizados no Laboratório de Micro e Nanotecnologia do departamento de Engenharia Mecânica da Colorado State University em Fort Collins, CO - EUA. Para as análises, foram utilizadas células tronco derivadas de tecido adiposo humano (*Adipose Derived Stem Cells, ADSC*). As amostras, discos de titânio com oxidação eletrolítica a plasma e com incorporação de biocerâmicas, foram submetidas à exposição de radiação UV, durante uma hora, para a esterilização. Como grupo de controle foram utilizadas amostras de titânio, somente com PEO, sem a incorporação das biocerâmicas.

As células foram usadas e replicadas até a segunda passagem e cultivadas em meio MEM-Alpha Modificacion (Hyclone®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo 100 IU/mL de penicilina (Hyclone®) e 0,1 mg/mL de estreptomicina, em estufa a 37 °C. A troca do meio foi realizada a cada dois dias.

Para a contagem, as células foram desaderidas da superfície do recipiente, com solução de 0,25% de tripsina, centrifugadas a 280 G por 10 minutos e contadas em câmara de Neubauer. As células cultivadas foram transferidas para placas de 48 poços contendo as superfícies de titânio modificado. O plaqueamento foi realizado utilizando 10.000 células/poço, sendo colocados 500  $\mu$ L em cada poço.

A bioatividade foi analisada quanto à viabilidade, proliferação, adesão celular em até sete dias e quanto à diferenciação celular em até três semanas.

### 3.5.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi analisada após 4 e 7 dias de cultivo sob as superfícies de titânio modificadas, utilizando o reagente CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Esse teste se baseia na habilidade das células vivas em converter um corante de redução (Resazurina) em um produto fluorescente (Resorufina). Células não viáveis (mortas) perdem rapidamente a capacidade metabólica e não geram o sinal fluorescente. Após a incubação das superfícies, o meio de cultivo foi aspirado e então foi adicionado 500  $\mu$ L de meio fresco + 50  $\mu$ L da solução de (10%) CellTiter-Blue®. Em seguida, foi realizada uma nova incubação por 8 horas em uma estufa a 37 °C. Após isso, 100  $\mu$ L da solução foram transferidos para uma placa de 96 poços para ser realizada a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (FLUOstar Omega). O comprimento de onda utilizado para a análise foi de 570 e 600 nm. O percentual de redução de CellTiter-Blue® foi calculado e descrito seguindo as instruções do fabricante.

### 3.5.2 Proliferação Celular

As células foram fixadas nas superfícies modificadas, após 4 e 7 dias de cultivo, com solução de 3,7% de formaldeído e permeabilizadas com solução de 1% de Triton X-100 diluído em PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Após isso as células foram marcadas com as sondas fluorescentes Rodamina (1:200) por 25 minutos, para corar os filamentos que evidenciam o citoesqueleto, e com Dapi (105  $\mu$ L/mL), para marcação do núcleo, por 5 minutos. Em seguida foram lavadas e mantidas em PBS até a análise com microscópio de fluorescência (Zeiss Imager.A2).

Foram capturadas 5 imagens de cada amostra usando 10x de magnitude. A contagem do número de células em cada superfície foi feita através do software ImageJ, contado pelo número de núcleos, marcados por Dapi.

### 3.5.3 Interação Célula/Biomaterial

Após 4 e 7 dias de cultivo, as células foram fixadas nas superfícies das amostras através do fixador primário, uma solução composta por 3% de glutaraldeído + 0,1 M de cacodilato de sódio + 0.1 M de sucrose por 45 minutos. Em seguida as amostras foram incubadas em uma solução tampão, composta por 0.1 M de cacodilato de sódio + 0.1 M de sacarose por 10 minutos. Após serem fixadas, as células foram desidratadas utilizando solução de 35, 50, 70 e 100% de álcool etílico, por 10 minutos, respectivamente. Em seguida foram incubadas por 10 minutos em solução de hexametildisilazano (HMDS). As superfícies foram então metalizadas com ouro e analisadas através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

### 3.5.4 Diferenciação Celular

#### 3.5.4.1 Fosfatase Alcalina

A concentração de fosfatase alcalina, que é indicadora da diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, foi analisada após 1, 2 e 3 semanas de cultivo. As células foram lisadas com 0,2% de Triton X-100 por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, 50 µL da solução foi transferida para uma placa de 96 poços com mais 150 µL da solução de trabalho do kit (ALP - Quantichrom Bioassay System). A análise foi feita através da leitura da placa no espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm, no tempo 0 e após 4 minutos e através do cálculo indicado pelo fabricante.

#### 3.5.4.2 Osteocalcina

A expressão das células ósseas diferenciadas foi feita através da quantificação da área de Osteocalcina, avaliada por imunofluorescência, após 1, 2 e 3 semanas de cultivo. Para isso, as células foram fixadas com 3,7% de formaldeído e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com 1% de Triton X-100 diluído em

PBS, por 3 minutos. Após isso foram incubadas por 30 minutos com BSA e em seguida incubadas com anti-osteocalcina (1:100) por 60 minutos em temperatura ambiente.

Na sequência, após lavagem com PBS, as amostras foram novamente incubadas por 45 minutos, com anticorpo secundário FITC (1:200 em PBS com 1% de BSA) e então marcadas com Rodamina (1:200) por 30 minutos, nos últimos 5 minutos foi acrescentado o marcador Dapi (105 µL/mL).

As amostras foram armazenadas em PBS, no escuro e a 4 °C, até a análise no microscópio de fluorescência. As imagens foram capturadas com 10x de magnitude e a porcentagem da área de Osteocalcina foi calculada através do software ImageJ.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises experimentais dos ensaios de bioatividade foram realizadas com 3 repetições para cada grupo e foram apresentados como média e desvio padrão. Para determinar a diferença estatística entre os grupos foi realizada a análise estatística de variância (ANOVA) e teste de comparação Tukey. A significância foi considerada com os seguintes valores de p: (\*) para  $p < 0,05$ ; (\*\*) para  $p < 0,01$ ; e (\*\*\*) para  $p < 0,001$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Microcal Origin 8.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES PRODUZIDAS

#### 4.1.1 Morfologia e Composição Química

A figura 16A mostra a morfologia, ampliada por MEV, da camada de óxido de  $\text{TiO}_2$  obtida através da PEO, sobre o Ti-G4. A superfície está de acordo com as superfícies obtidas por Laurindo *et al.* (2017), que utilizou as mesmas condições de ensaio, e Yerokhin *et al.* (1999) que explica a presença dos poros, causada pela ruptura dielétrica da camada de óxido.

A composição química foi avaliada por EDS para confirmar a incorporação de íons de cálcio e fósforo na nova superfície, como mostra a figura 16B. A literatura avalia a quantidade desses elementos por uma razão de Ca/P e considera o valor de 1.67/1 (razão encontrada no tecido ósseo) como razão mínima para melhorar as propriedades de bioatividade do titânio (Terleeva *et al.*, 2010; Abbasi *et al.*, 2011). Laurindo *et al.* (2014) mostra que essa razão permanece acima do valor mínimo em processos de PEO que utilizam tensão maior que 300 V.

A figura 17 mostra a superfície após a deposição das biocerâmicas. É possível observar que em todos os grupos, apesar das diferenças de tamanho e de morfologia, as partículas foram incorporadas dentro dos poros. A literatura mostra resultados da incorporação de HAp através da técnica de eletroforese na camada  $\text{TiO}_2$  obtida por PEO. Kim *et al.* (2009) avaliou a variação de concentração de etanol (em volume) no eletrólito durante o processo e a superfície obtida com 25% do mesmo, onde é encontrada a maior quantidade de HAp, mostra similaridade com a superfície que obtivemos através da deposição mecânica manual, que tem a vantagem de ser um processo mais simples que a eletroforese.

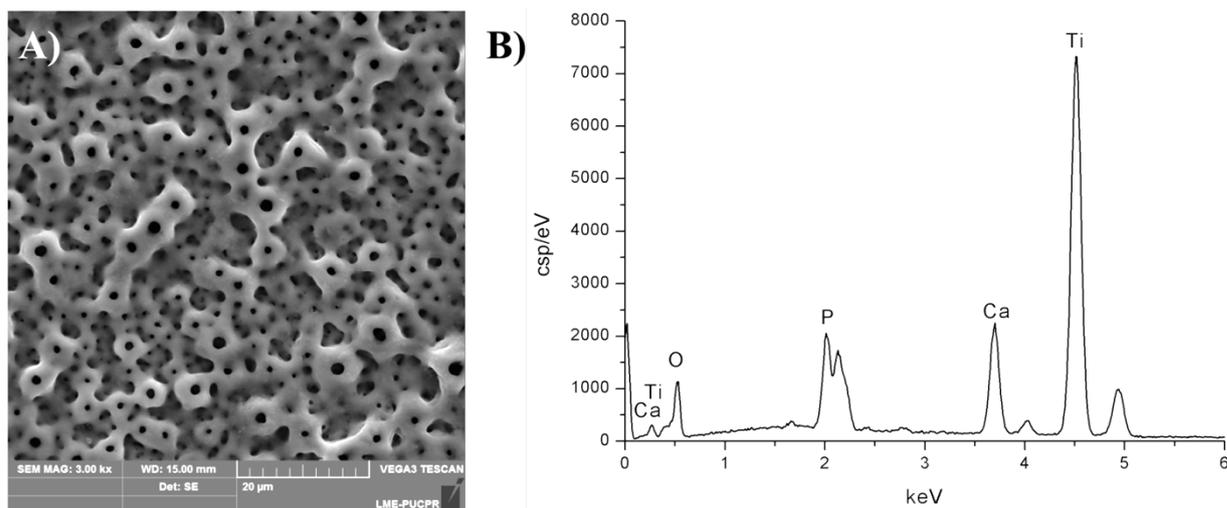


Figura 16. A) Análise da superfície de  $\text{TiO}_2$ , em discos de Ti-G4, obtida após o PEO. A escala corresponde a 20  $\mu\text{m}$ ; B) Análise química através de EDS da superfície de óxido de  $\text{TiO}_2$ , obtida após PEO.

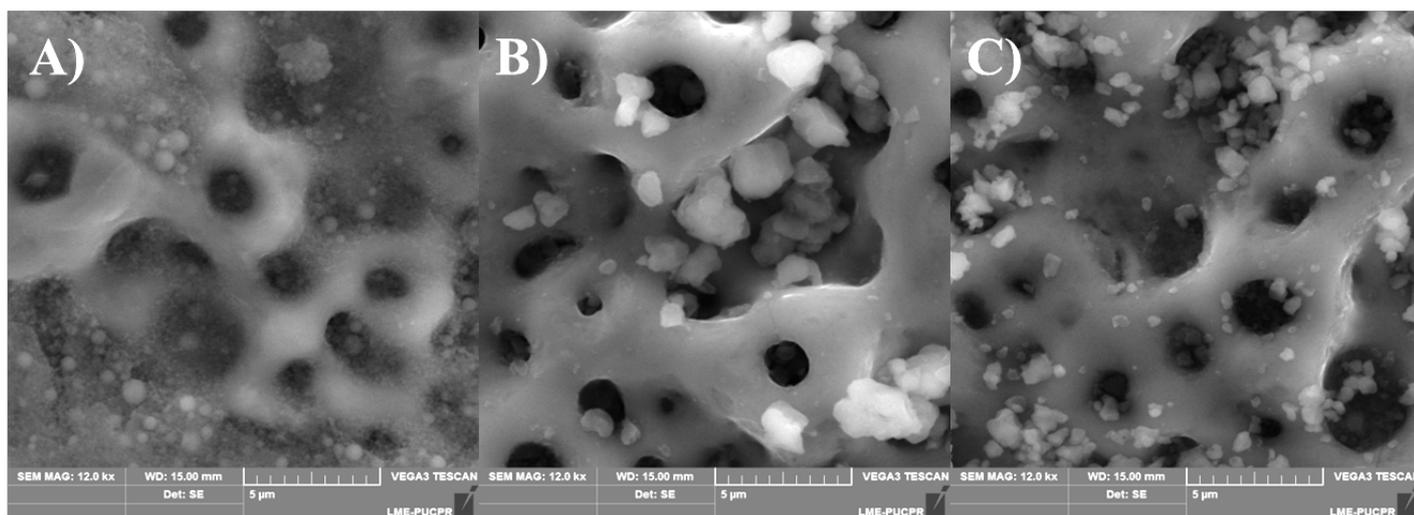


Figura 17. Eletromicrografia da superfície após deposição das partículas de biocerâmicas. A) HAp; B) Biovidro 45S5 e C) PBG. A escala corresponde a 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.1 Adesão das partículas biocerâmicas

A análise por MEV/EDS dos implantes foi feita antes e depois da inserção no poliuretano, como é mostrado pela figura 18. São implantes com superfície modificada por PEO e com deposição de biovidro PBG.

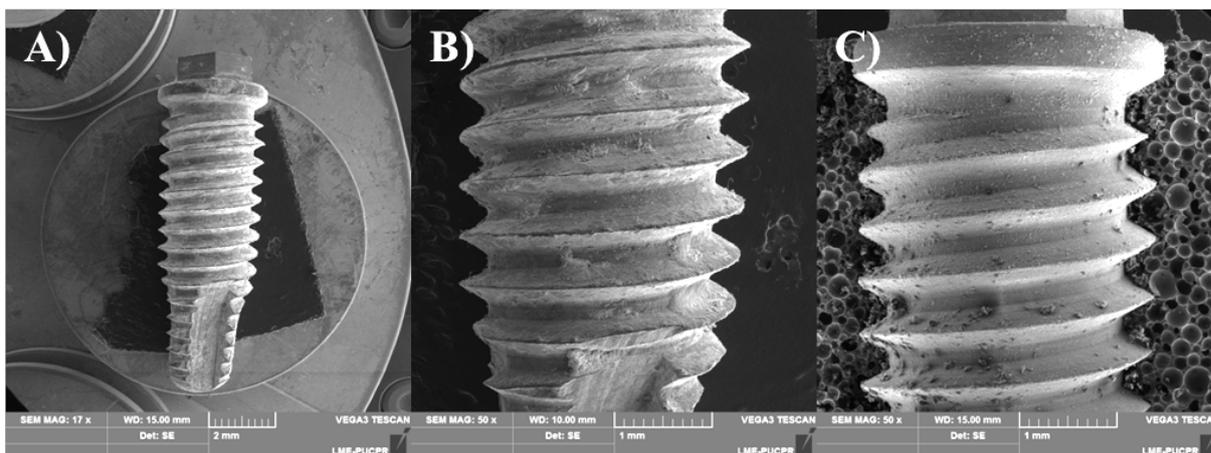


Figura 18. Imagens de MEV dos implantes A) e B) antes da inserção, C) depois da inserção no poliuretano. A escala corresponde a A) 2 mm B) e C) 1 mm.

Após a inserção dos implantes no poliuretano, foi feita a EDS pontual para comprovar que as partículas dentro dos poros eram de biocerâmicas e não resíduos do poliuretano. A figura 19 mostra eletromicrografia do implante antes e depois da inserção, com HAp, biovidro 45S5 e biovidro PBG, respectivamente. Os resultados foram comparados com titânio usinado, implante sem tratamento de superfície, onde se observa o deslocamento total das partículas em sua superfície. Em todos os grupos, as partículas foram protegidas do deslocamento pelos poros obtidos através do PEO.

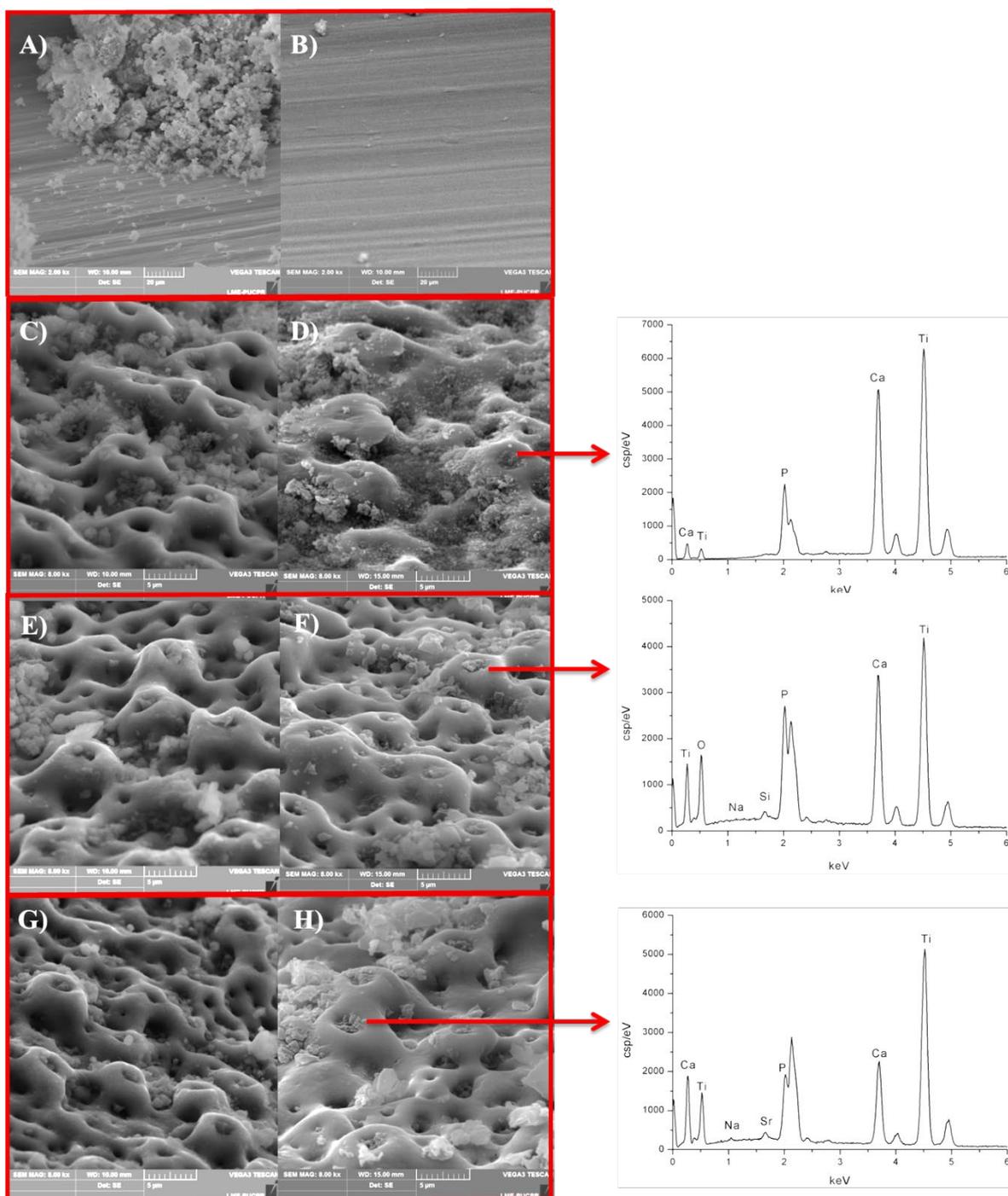


Figura 19. Imagens de MEV para verificar a permanência das partículas dentro dos poros antes e após a inserção no poliuretano, com o respectivo EDS após a inserção. A) e B) Titânio usinado; C) e D) HAp; E) e F) 45S5 e G) e H) PBG. A escala corresponde a 1 µm.

#### 4.1.2 Dissolução

O resultado obtido através do ICP, na dissolução em meio de cultivo celular, do biovidro PBG, 45S5 e HAp é apresentado nas figuras 20, 21 e 22, respectivamente. Os gráficos mostram linhas tracejadas como o controle (só meio de cultivo) e o meio de

cultivo com as respectivas superfícies nas linhas cheias. É possível observar o início da dissolução logo a partir do primeiro dia, em todos os grupos, pelo aumento do número de íons dos elementos presentes nas respectivas biocerâmicas. Apesar disso os resultados foram inconclusivos, pois o aumento da concentração de íons foi muito baixo, apresentando pouca diferença com o controle.

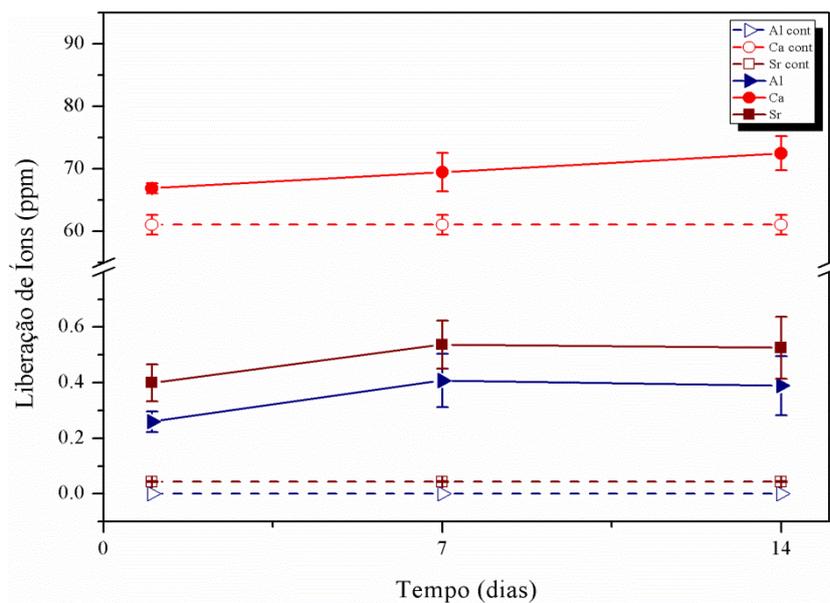


Figura 20. Análise de ICP da dissolução do biovidro PBG em meio de cultivo celular. As linhas tracejadas representam íons liberados pelo controle e as linhas cheias pelo meio de cultivo com PBG.

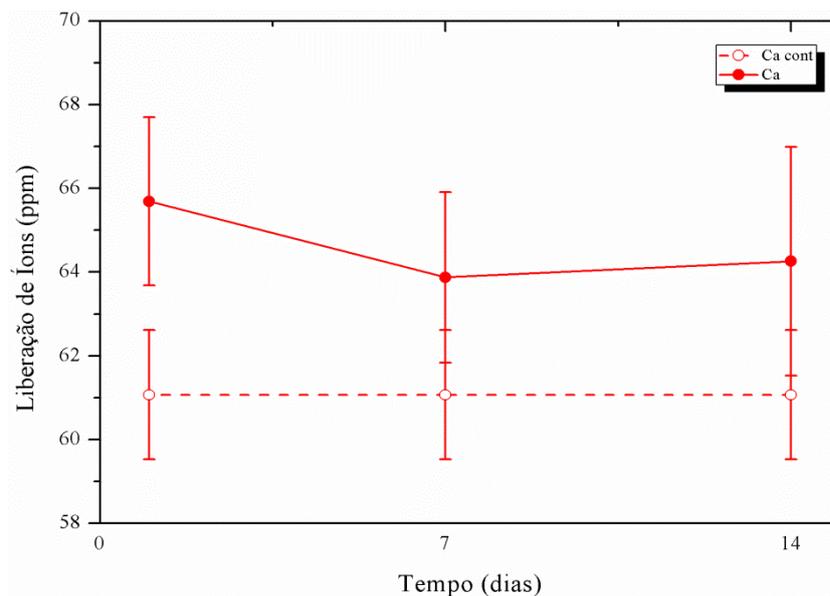


Figura 21. Análise de ICP da dissolução de HAp em meio de cultivo celular. As linhas tracejadas representam íons liberados pelo controle e as linhas cheias pelo meio de cultivo com HAp.

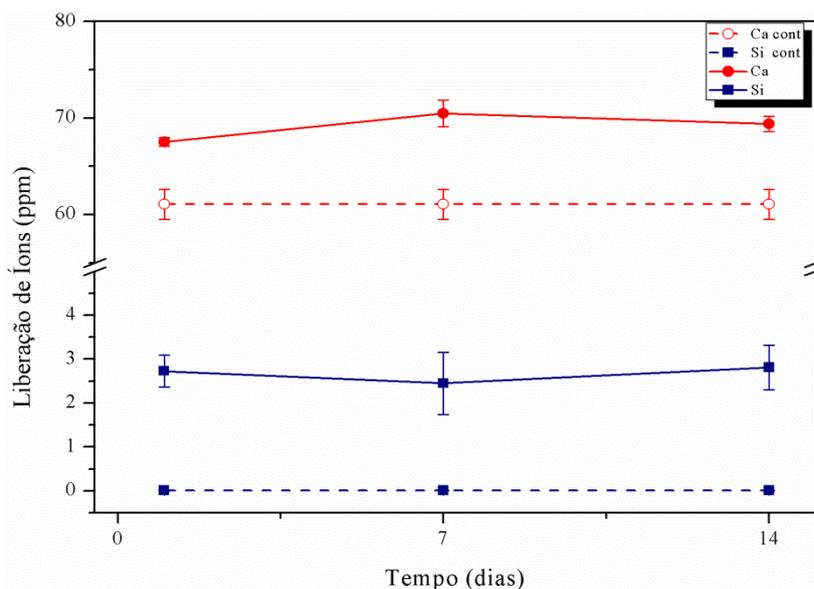


Figura 22. Análise de ICP da dissolução do biovidro 45S5 em meio de cultivo celular. As linhas tracejadas representam íons liberados pelo controle e as linhas cheias pelo meio de cultivo com 45S5.

Como os resultados obtidos através da análise de ICP foram inconclusivos, resolvemos testar o método de dissolução de partículas que segue a norma ISO 10993-14, utilizando meio de dissolução de TRIS+HCl. A figura 23 compara a dissolução do biovidro comercial 45S5 e do biovidro PBG. É possível observar que o biovidro 45S5 começa a se dissolver rapidamente, enquanto o biovidro PBG tem um aumento na dissolução somente depois de 21 dias. O comportamento do PBG está de acordo com o estudo de Weiss *et al.* (2014), que mostra o resultado da sua dissolução, com a mesma composição, através de porcentagem de perda de massa. Os resultados mostram um crescimento notável depois de 21 dias de dissolução. Isso se deve a presença de Sr na composição do biovidro, que é um elemento modificador de rede. Estudos mostram que biovidros a base de fosfato de cálcio com composição  $P_2O_5 - CaO - Na_2O$ , sem presença de Sr, possuem menor durabilidade química e maior taxa de dissolução (Kiani *et al.*, 2012). Além disso, a presença de alumina (proveniente do cadinho para a fusão do vidro PBG) pode também retardar sua dissolução.

De acordo com Pryce e Hench (2003), que avaliaram a dissolução do biovidro 45S5 através da análise de ICP, o biovidro 45S5 possui uma rápida degradação durante as horas iniciais do teste, mas tende a estabilizar seu comportamento, o que pode ser observado também, nos nossos resultados. Essa redução na taxa de dissolução ocorre devido aos

íons de cálcio que possuem dificuldade de atravessar a camada rica em sílica para o meio aquoso.

A dissolução da HAp não foi possível de ser realizada no mesmo teste, pois as partículas usadas no trabalho são pequenas, sendo difícil filtrar para a pesagem de perda de massa. Porém estudos mostram que sua dissolução é lenta e quase inexistente (Lower et al., 1998, Wu et al., 2001, Tang et al., 2003).

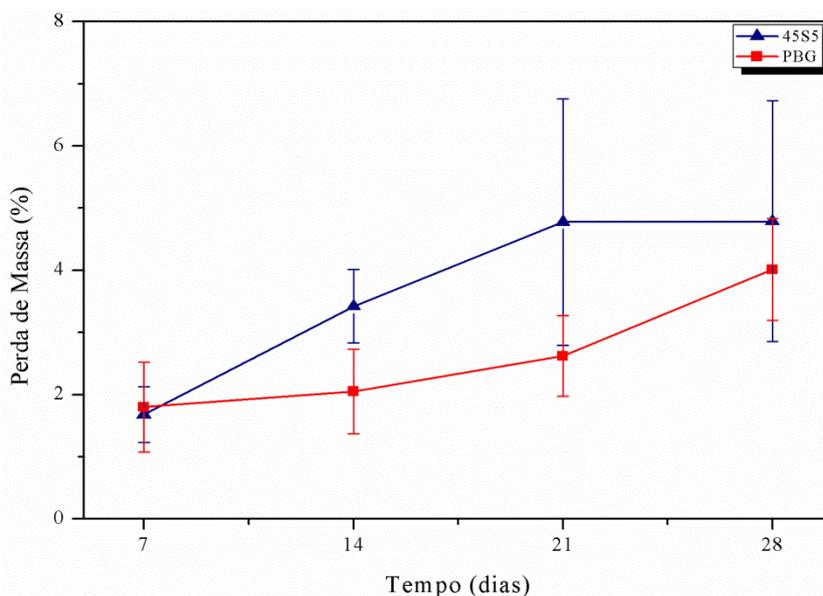


Figura 23. Dissolução do biovidro 45S5 e do PBG em solução TRIS+HCL.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

### 4.2.1 Viabilidade e Proliferação Celular

A viabilidade celular é calculada pela porcentagem de redução do reagente CellTiter-Blue®. A figura 24 mostra o gráfico da viabilidade no dia 4 e no dia 7 de cultivo celular. Os únicos grupos que apresentaram diferença estatística com o controle (PEO) foram o grupo 45S5 e o grupo PBG no dia 7 de cultivo celular.

O grupo 45S5 apresentou a maior média de crescimento entre os dias, mas apesar disso é possível observar que em nenhum dos grupos a superfície foi tóxica e que todos se apresentaram viáveis para o crescimento celular.

O comportamento das amostras de PEO durante cultivo celular é mostrado por Wu *et al.* (2015), o qual mostra que, apesar das superfícies apresentarem uma maior tendência a proliferação e diferenciação celular, durante os primeiros dias de cultivo ela pode apresentar pouco crescimento. Segundo esse estudo, essas diferenças no comportamento celular podem ser devido a uma sinergia geral da rugosidade superficial, tamanho dos poros, energia superficial, composição química e outras características.

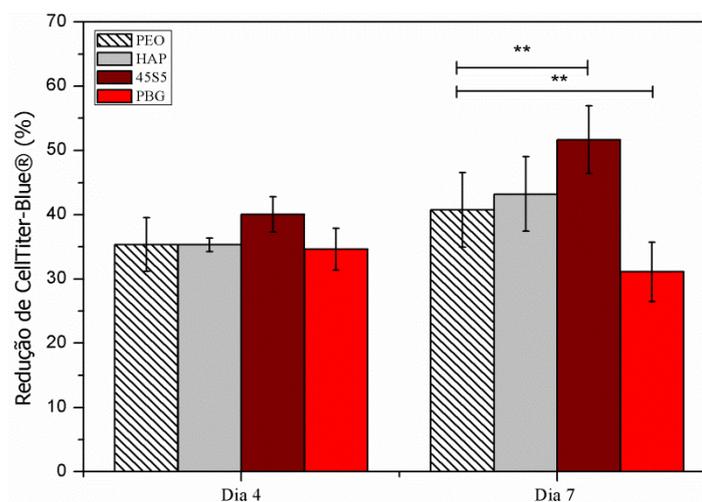


Figura 24. Viabilidade celular feita através da redução de CellTiterBlue®. Análise estatística representada por (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

A contagem do número de células presentes na superfície no dia 4 e no dia 7 de cultivo foram feitas através de imagens de microscopia de fluorescência utilizando o software ImageJ e apresentadas na figura 25. Os únicos grupos que apresentaram diferença estatística entre os dias 4 e 7 foram o 45S5 e o PBG.

Podemos observar que a média do grupo do biovidro PBG diminuiu consideravelmente no dia 7 de cultivo celular, essa perda pode estar relacionada a adesão de células no fundo do poço da placa de cultivo e não na superfície da amostra. Sugerimos que com a maior dissolução do grupo 45S5 nos primeiros dias de cultivo celular, a ligação Si-OH formada pela hidrólise da sílica tenha favorecido a proliferação e a viabilidade (Hench *et al.*, 1993, Ostomel *et al.*, 2006, Islam *et al.*, 2017, ).

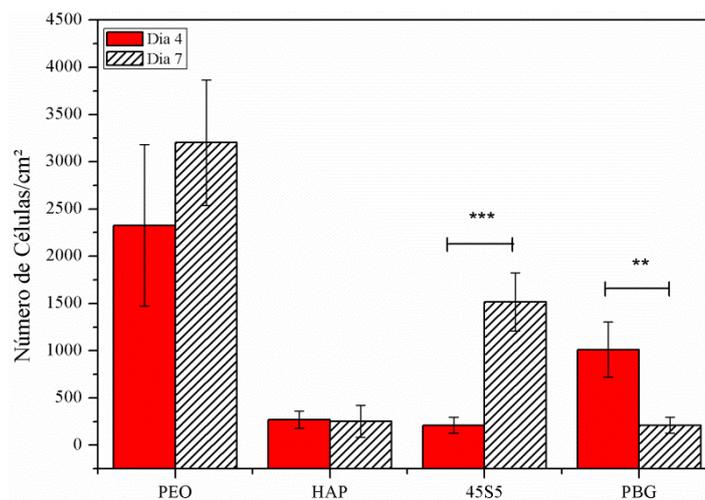


Figura 25. Número de células presentes nas superfícies dos grupos, no dia 4 e 7 de cultivo celular. Análise estatística representada por (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2 Interação Célula/Superfície

A interação das células com a superfície é mostrada através de imagens de MEV nos dias 4 e 7 de cultivo celular (estudo curto) e semana 1 e semana 3 (diferenciação). A figura 26 mostra imagens do estudo curto (setas indicam a presença das células). É possível observar que todos os grupos mostraram baixa densidade de células, o que pode ser explicado por estarem em poucos dias de cultivo. Wu *et al.* (2015) mostram imagens de MEV da interação da superfície de PEO com células de osteosarcoma, são mais arredondadas nos primeiros dias de cultivo celular e tendem a se alongar, melhorando a interação com a superfície.

Xynos *et al.* (2000) avaliaram a interação de osteoblastos na superfície do biovidro 4SS5, que estão de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho. Com dois dias de cultivo elas ainda eram mais arredondadas, porém com seis dias elas já se apresentavam mais espalhadas e fixadas, entendendo que o substrato auxiliou em sua ancoragem e espalhamento.

Já no estudo de diferenciação (figura 27) todos os grupos apresentaram crescimento da interação celular com a superfície. Em todos os grupos, ocorreu a formação de uma “camada celular” sobre a superfície, não apresentando diferença aparente entre eles na semana 3.

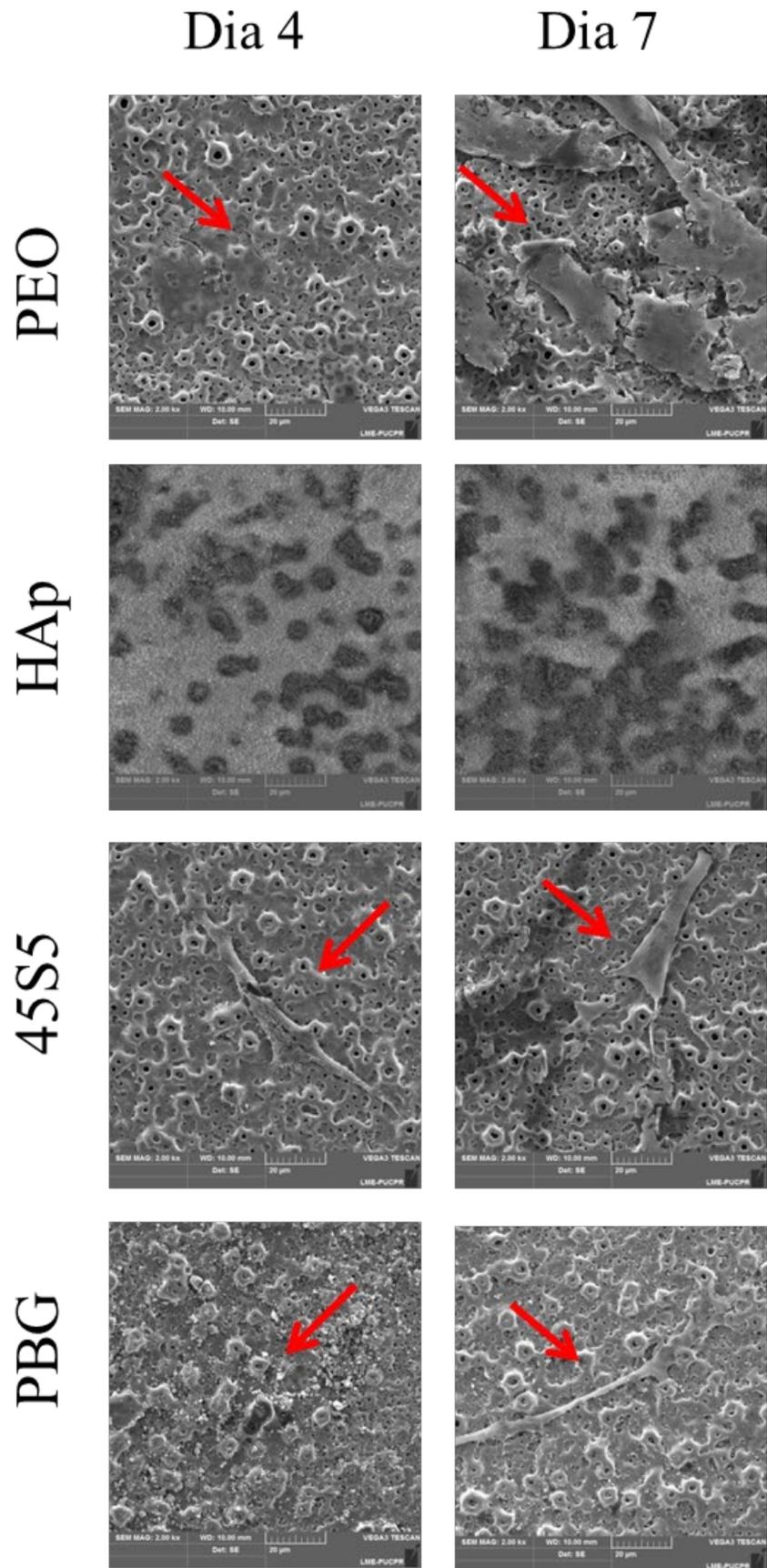


Figura 26. Superfícies após cultivo celular em 4 e 7 dias.

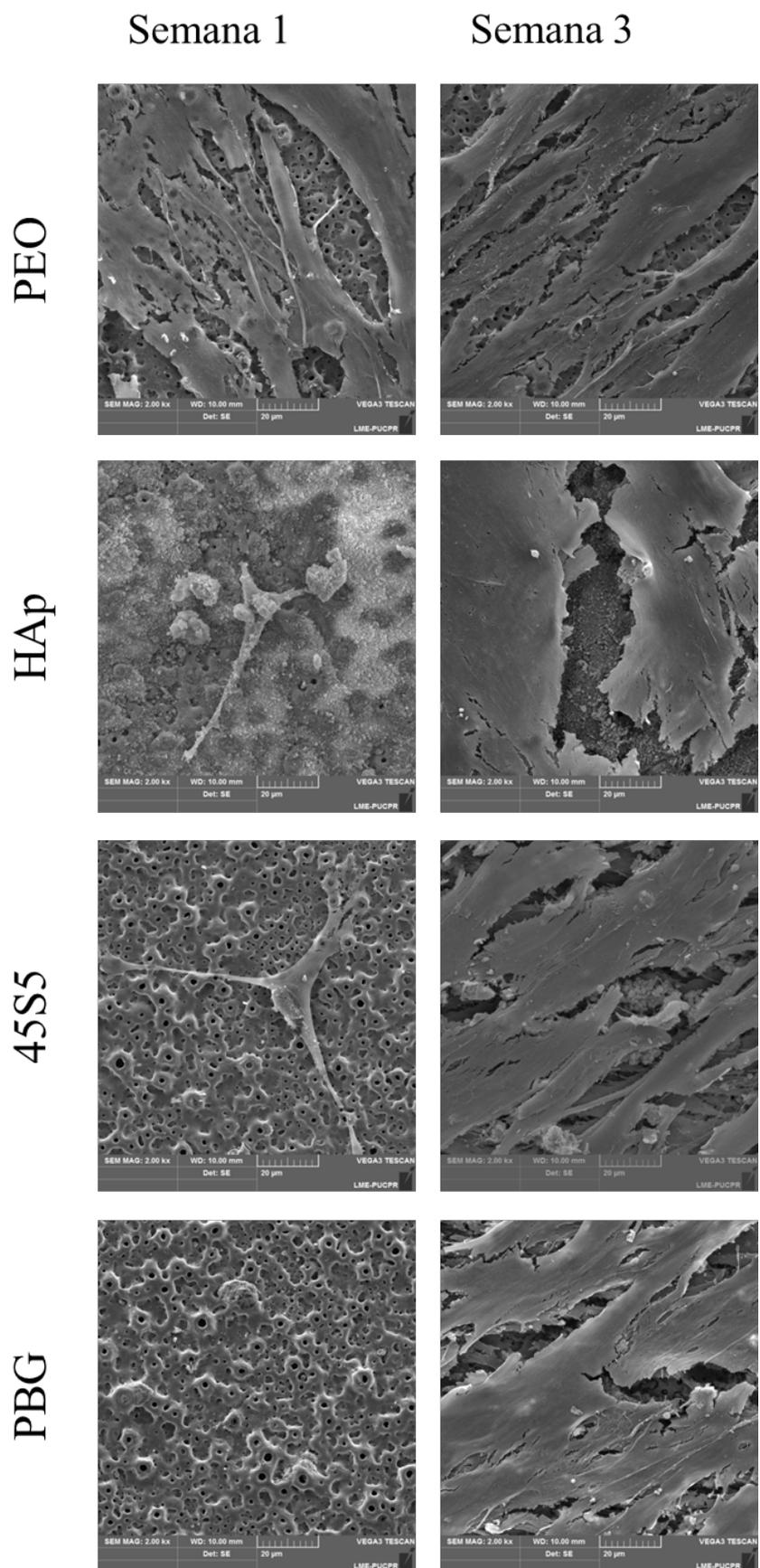


Figura 27. Superfícies durante a diferenciação celular em 1 e 3 semanas. A escala corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.3 Diferenciação Celular

#### 4.2.3.1 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é a primeira proteína que indica a presença de células ósseas na superfície do implante. Sua análise é feita comparando a quantidade dessa proteína, específica de osteoblastos, com todas as proteínas presentes na superfície.

A figura 28 mostra o aumento da quantidade de ALP durante a semana 1 e semana 3. Somente o grupo 45S5 não apresentou diferença estatística com o controle durante a primeira semana de cultivo celular. Já na terceira semana, todos os grupos apresentaram diferença estatística com o controle. O grupo que apresentou a maior média de ALP em sua superfície foi o biovidro PBG. Estudos mostram que quanto maior a atividade de ALP maior proliferação e diferenciação das células ADSC em células ósseas (Stein *et al.*, 1990; Grafenau *et al.*, 2000). Kim *et al.* (2009) também observaram o crescimento da atividade de ALP em uma superfície com HAp em poros de TiO<sub>2</sub> através da técnica de eletroforese em relação às superfícies de Ti puro e PEO. Abou Neel *et al.* (2014) mostram uma alta atividade de ALP em vidros à base de fosfato de cálcio com TiO<sup>+</sup> em sua composição, o que pode ser comparado ao resultado obtido pelo biovidro PBG em nosso estudo. Esse comportamento pode ser explicado pela liberação de íons de Ca e P durante sua dissolução, que altera o comportamento e a resposta celular da superfície, podendo favorecer a adesão e proliferação de células e, conseqüentemente, melhorar a capacidade de osseointegração (Maeno *et al.*, 2005; Abou Neel *et al.*, 2009; Hoppe *et al.*, 2011).

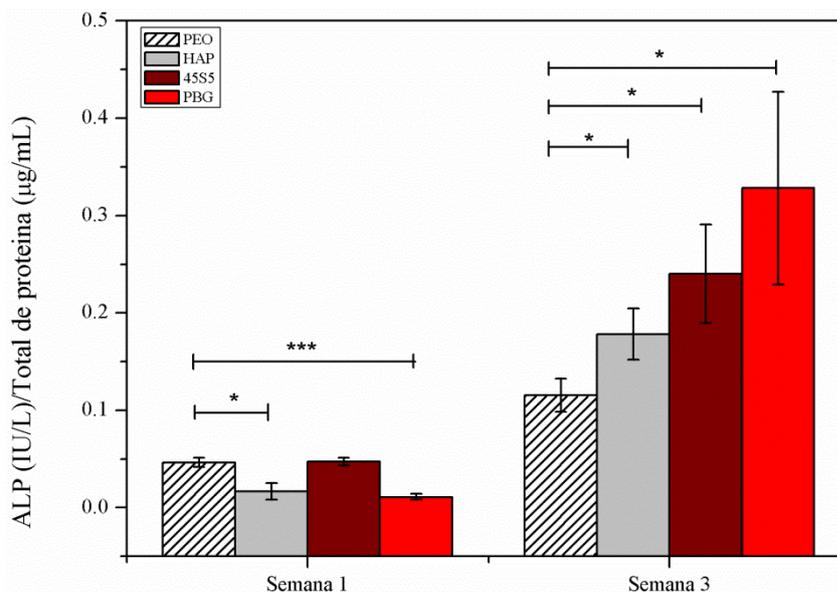


Figura 28. Quantidade de Fosfatase Alcalina nas superfícies, durante a semana 1 e semana 3 da diferenciação celular. Diferença estatística representada por (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 4.2.3.2 Osteocalcina

A osteocalcina é a proteína mais abundante durante a formação da matriz óssea, e indica o início do processo de mineralização. A produção de osteocalcina é um marcador do osteoblasto maduro, ou seja, na formação do tecido ósseo. Nas imagens de microscopia de fluorescência (figura 29), sua presença é marcada pela cor verde (anticorpo secundário conjugado ao FITC, utilizado no protocolo de preparação das amostras para imunofluorescência).

É possível observar uma formação significativa de osteocalcina em todos os grupos após 3 semanas de ensaio, sendo que no grupo do biovidro PBG sua quantidade é visivelmente maior. Isso pode ser explicado pela dissolução do biovidro PBG, que tem início somente após 7 dias no organismo, com crescimento elevado da dissolução a partir de 21 dias, como mostra Weiss *et al.* (2014). Estudos mostram que com sua dissolução, são liberados íons de Ca e P no meio que podem favorecer a diferenciação celular (Abou Neel *et al.*, 2014; Maeno *et al.*, 2005; Abou Neel *et al.*, 2009; Hoppe *et al.*, 2011; Julien *et al.*, 2009). O cálcio é um elemento essencial para a formação óssea e ele, como íon, é capaz de realizar ligações com moléculas de proteínas da matriz óssea que desempenham um papel muito importante para atrair osteoblastos à superfície do implante (Sul *et al.*, 2004), o que pode justificar a maior quantidade de osteocalcina.

Os bons resultados obtidos pelo grupo 45S5 podem ser justificados pelas ligações Si-OH que permitem a formação de uma camada de apatita ao redor de sua superfície, que atrai células formadoras de tecidos ósseos e acelera o processo de osseointegração (Islam *et al.*, 2017).

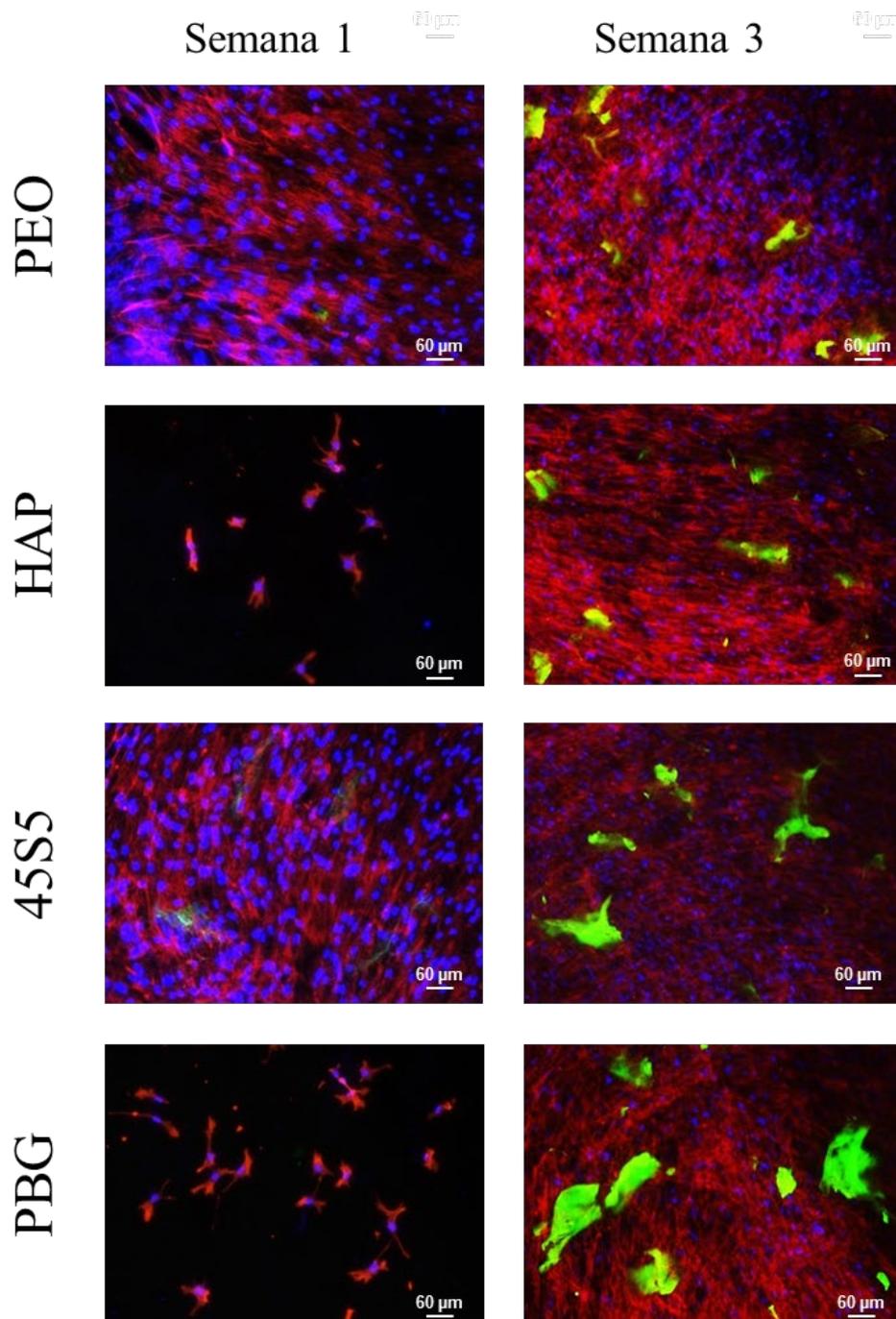


Figura 29. Microscópio de Fluorescência durante a semana 1 e semana 3 da diferenciação celular. Ampliação 10x e escala 60 µm.

A porcentagem da área de osteocalcina normalizada pelo número de células em cada superfície é mostrada na figura 30. Na primeira semana da diferenciação celular, o único grupo que apresentou diferença estatística com o controle foi a HAp, a qual não apresentou quantidade significativa da proteína. Quando comparamos o aumento da área na semana 3, observamos que os únicos grupos que nenhum grupo apresentou diferença estatística com o controle.

Apesar disso, a maior média de crescimento de área foi do grupo biovidro PBG, que confirma que sua dissolução e liberação de íons para o meio ou o organismo favorecem o crescimento de células ósseas ao seu redor.

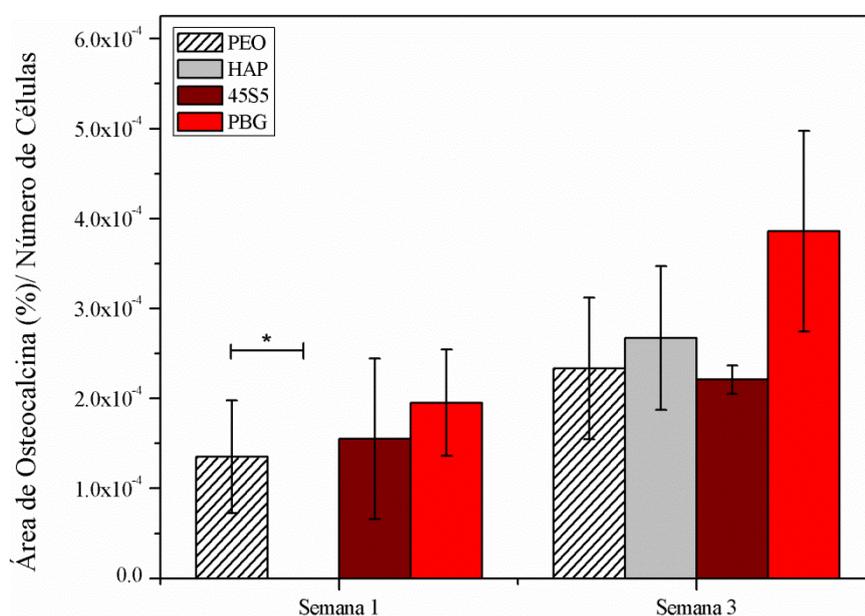


Figura 30. Área de Osteocalcina normalizada pelo número de células em cada superfície, durante a diferenciação celular em 1 e 3 semanas. Diferença estatística representada por (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*).

## 5. CONCLUSÕES

A combinação da técnica de PEO com a deposição mecânica de biocerâmicas foi utilizada com sucesso para produzir uma camada de revestimento bioativo na superfície dos implantes de Ti, sem a ocorrência de deslocamento. As partículas permaneceram protegidas dentro poros, mesmo após inserção do implante no poliuretano.

O comportamento celular das superfícies durante o cultivo foi afetado pela presença de partículas de biovidros. Principalmente para as amostras de PEO+45S5 e PEO + PBG, que apresentaram uma maior atividade de ALP e de produção de osteocalcina em comparação com a superfície somente com PEO e PEO+HAp após a semana 3. Esta melhora foi atribuída à incorporação bem sucedida de partículas de biovidro nos poros da camada de TiO<sub>2</sub> e devido à dissolução dessas partículas, que favoreceram o crescimento de células formadoras de tecido ósseo.

Isso sugere que todos os grupos que combinaram a técnica de PEO com a deposição de biovidros formam uma superfície bioativa, e poderá ser utilizada para melhorar a osseointegração de implantes biomédicos.

## 6. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a possibilidade de outros métodos de deposição das biocerâmicas nos poros de TiO<sub>2</sub> obtidos através do PEO;
- Avaliar o impacto da mudança do pH pela dissolução das biocerâmicas durante o cultivo celular;
- Realizar os testes de cultivo celular utilizando outras combinações de biovidros a base de fosfato de cálcio, com diferentes níveis de degradação;
- Avaliar uma possível técnica de dissolução mais efetiva para HAp.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABOU NEEL, E. A., Chrzanowski, W., Georgiou, G., Dalby, M. J., & Knowles, J. C.. In vitro biocompatibility and mechanical performance of titanium doped high calcium oxide metaphosphate-based glasses. *Journal of Tissue Engineering* (2010), 1(1): 390127.
- ABOU NEEL, E. A., Chrzanowski, W., Valappil, S. P., O'Dell, L. A., Pickup, D. M., Smith, M. E., & Knowles, J. C.. Doping of a high calcium oxide metaphosphate glass with titanium dioxide. *Journal of Non-Crystalline Solids* (2009), 355(16-17): 991-1000.
- ABOU NEEL, E. A., Chrzanowski, W., & Knowles, J. C.. Biological performance of titania containing phosphate-based glasses for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering* (2014): C35: 307-313.
- BEST, S. M., Porter, A. E., Thian, E. S., & Huang, J. Bioceramics: past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society* (2008), 28(7): 1319-1327.
- BRAY, George A. Medical consequences of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2004), 89(6): 2583-2589.
- BRUNETTE, D. M., Tengvall, P., Textor, M., & Thomsen, P. (Eds).. *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*. Springer Science & Business Media (2012).
- BUNNELL, Bruce A. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* (2008), 45(2): 115-120.
- CATLEDGE, S. A., Fries, M. D., Vohra, Y. K., Lacefield, W. R., Lemons, J. E., Woodard, S., & Venugopalanc, R. Nanostructured ceramics for biomedical implants. *Journal of nanoscience and nanotechnology* (2002), 2(3-4): 293-312.
- CHENG, H. C., Lee, S. Y., Chen, C. C., Shyng, Y. C., & Ou, K. L.. Titanium nanostructural surface processing for improved biocompatibility. *Applied physics letters* (2006), 89(17): 173902.
- COWDEN, Kari; Dias-Netipanyj, Marcela Ferreira; Popat, Ketul C. Effects of titania nanotube surfaces on osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Nanomedicine* (2019), 17: 380-390.
- DAS, K., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Karandikar, B., & Gibbins, B. L. Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti

- implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (2008), 87(2): 455-460.
- DIAMANTI, M. V., & Pedefferri, M. P.. Effect of anodic oxidation parameters on the titanium oxides formation. *Corrosion Science* (2007), 49(2): 939-948.
- DUNLEAVY, C. S., Golosnoy, I. O., Curran, J. A., & Clyne, T. W.. Characterisation of discharge events during plasma electrolytic oxidation. *Surface and Coatings Technology* (2009), 203(22): 3410-3419.
- ELIAS, C. N., Oshida, Y., Lima, J. H. C., & Muller, C. A.. (Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* (2008), 1(3): 234-242.
- ERGUN, C., Doremus, R., & Lanford, W. (2003). Hydroxylapatite and titanium: Interfacial reactions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2003), 65(3): 336-343.
- GEETHA, M., Singh, A. K., Asokamani, R., & Gogia, A. K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review. *Progress in materials science* (2009), 54(3): 397-425.
- GIMBLE, Jeffrey M. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert opinion on biological therapy* (2003), 3(5): 705-713.
- GRAFENAU, P., Carstanjen, B., & Lepage, O. M.. Osteocalcin-a biochemical marker of bone formation in equine medicine. *Veterinarni Medicina-UZPI* (2000), 45(7): 209-16.
- GUPTA, P., Tenhundfeld, G., Daigle, E. O., & Ryabkov, D. Electrolytic plasma technology: Science and engineering - An overview. *Surface and Coatings Technology* (2007), 201(21): 8746-8760.
- HENCH, L. L.. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society* (1991), 74(7): 1487-1510.
- HENESS, G. L., & Ben-Nissan, B. Innovative bioceramics. *Materials Forum* (2004), 27: 104 – 114.
- HORNBERGER, H., Virtanen, S., & Boccaccini, A. R. Biomedical coatings on magnesium alloys—a review. *Acta biomaterialia* (2012), 8(7): 2442-2455.
- HOPPE, A., Güldal, N. S., & Boccaccini, A. R.. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* (2011), 32(11): 2757-2774.

- HUSSEIN, R. O., & Northwood, D. O. Production of anti-corrosion coatings on light alloys (Al, Mg, Ti) by plasma-electrolytic oxidation (PEO). In *Developments in Corrosion Protection* (2014). IntechOpen.
- IAMONI, F., Rasperini, G., Trisi, P., & Simion, M.. Histomorphometric analysis of a half hydroxyapatite-coated implant in humans: a pilot study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* (1999), 14(5): 729-735.
- ISHIZAWA, H., & Ogino, M. Formation and characterization of anodic titanium oxide films containing Ca and P. *Journal of biomedical materials research* (1995), 29(1): 65-72.
- ISLAM, M. T., Felfel, R. M., Abou Neel, E. A., Grant, D. M., Ahmed, I., & Hossain, K. M. Z. Bioactive calcium phosphate-based glasses and ceramics and their biomedical applications: a review. *Journal of tissue engineering* (2017), 8: 2041731417719170.
- JULIEN, M., Khoshniat, S., Lacreusette, A., Gatius, M., Bozec, A., Wagner, E. F. & Magne, D. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: Role of ERK1/2 and Fra-1. *Journal of Bone and Mineral Research* (2009), 24(11): 1856-1868.
- KIM, H. W., Kim, H. E., Salih, V., & Knowles, J. C.. Hydroxyapatite and titania sol-gel composite coatings on titanium for hard tissue implants; mechanical and in vitro biological performance. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (2005), 72(1): 1-8.
- KIM, D. Y., Kim, M., Kim, H. E., Koh, Y. H., Kim, H. W., & Jang, J. H.. Formation of hydroxyapatite within porous TiO<sub>2</sub> layer by micro-arc oxidation coupled with electrophoretic deposition. *Acta Biomaterialia* (2009), 5(6): 2196-2205.
- KNOWLES, J. C., Franks, K., & Abrahams, I. Investigation of the solubility and ion release in the glass system K<sub>2</sub>O–Na<sub>2</sub>O–CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. *Biomaterials* (2001), 22(23): 3091-3096.
- KUNG, K. C., Lee, T. M., Chen, J. L., & Lui, T. S.. Characteristics and biological responses of novel coatings containing strontium by micro-arc oxidation. *Surface and Coatings Technology* (2010), 205(6): 1714-1722.
- LAI, W., Garino, J., & Ducheyne, P. Silicon excretion from bioactive glass implanted in rabbit bone. *Biomaterials* (2002), 23(1): 213-217.

- LAURINDO, C. A., Bembem, L. M., Torres, R. D., Mali, S. A., Gilbert, J. L., & Soares, P. Influence of the annealing treatment on the tribocorrosion properties of Ca and P containing TiO<sub>2</sub> produced by plasma electrolytic oxidation. *Materials Technology* (2016), 31(12), 719-725.
- LAURINDO, C. A., Torres, R. D., Mali, S. A., Gilbert, J. L., & Soares, P. Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density. *Materials Science and Engineering* (2014): C37: 223-231.
- LI, L. H., Kong, Y. M., Kim, H. W., Kim, Y. W., Kim, H. E., Heo, S. J., & Koak, J. Y. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials* (2004), 25(14): 2867-2875.
- LIU, F., Wang, F., Shimizu, T., Igarashi, K., & Zhao, L. Hydroxyapatite formation on oxide films containing Ca and P by hydrothermal treatment. *Ceramics International* (2006), 32(5): 527-531.
- LOWER, S. K., Maurice, P. A., & Traina, S. J. (1998). Simultaneous dissolution of hydroxylapatite and precipitation of hydroxypyromorphite: Direct evidence of homogeneous nucleation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62(10): 1773-1780.
- MAENO, S., Niki, Y., Matsumoto, H., Morioka, H., Yatabe, T., Funayama, A., Toyama, Y., Taguchi, T., Tanaka, J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* (2005), 26(23): 4847-4855.
- MAVROGENIS, A. F., Dimitriou, R., Parvizi, J., & Babis, G. C.. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact* (2009), 9(2): 61-71.
- NIH Consensus Statement, Clinical Applications of Biomaterials (1982), 4(5):1-19.
- NOMINE, A., Troughton, S. C., Nominé, A. V., Henrion, G., & Clyne, T. W. High speed video evidence for localised discharge cascades during plasma electrolytic oxidation. *Surface and Coatings Technology* (2015), 269: 125-130.
- ORTHOPEDICS                      Biologics                      Feature,                      disponível                      em:  
<<https://ryortho.com/2014/10/bioglass-is-back-in-an-incredible-new-form/>>  
Acesso:21/03/19.
- OSAKA                      FUJI                      Corporation,                      disponível                      em:  
<[https://www.ofic.co.jp/en/r\\_and\\_d/thermalspraying/](https://www.ofic.co.jp/en/r_and_d/thermalspraying/)> Acesso: 21/03/19.
- OSTOMEL, T. A., Shi, Q., Tsung, C. K., Liang, H., & Stucky, G. D. Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity. *Small* (2006), 2(11): 1261-1265.

- PARDO, A., Casajús, P., Mohedano, M., Coy, A. E., Viejo, F., Torres, B., & Matykina, E. Corrosion protection of Mg/Al alloys by thermal sprayed aluminum coatings. *Applied Surface Science* (2009), 255(15): 6968-6977.
- PARK, K. H., Heo, S. J., Koak, J. Y., Kim, S. K., Lee, J. B., Kim, S. H., & Lim, Y. J. Osseointegration of anodized titanium implants under different current voltages: a rabbit study. *Journal of oral rehabilitation* (2007), 34(7): 517-527.
- PRYCE, R. S., & Hench, L. L. Dissolution characteristics of bioactive glasses. *Key Engineering Materials* (2003), 240: 201-204.
- PULYALA, P., Singh, A., Dias-Netipanyj, M.F., Cogo, S.C., Santos, L.S., Soares, P., Gopal, V., Suganthan, V., Manivasagam, G., Popat, K.C. In-vitro cell adhesion and proliferation of adipose derived stem cell on hydroxyapatite composite surfaces. *Materials Science and Engineering: C* (2017), 75: 1305-1316.
- RAHAMAN, M. N., Day, D. E., Bal, B. S., Fu, Q., Jung, S. B., Bonewald, L. F., & Tomsia, A. P. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia* (2011), 7(6): 2355-2373.
- RATNER, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* (2004). Elsevier.
- RIBEIRO, A. R., Oliveira, F., Boldrini, L. C., Leite, P. E., Falagan-Lotsch, P., Linhares, A. B. R., ... & Archanjo, B. S. Micro-arc oxidation as a tool to develop multifunctional calcium-rich surfaces for dental implant applications. *Materials Science and Engineering C* (2015), 54: 196-206.
- RUPP, F., Scheideler, L., Olshanska, N., De Wild, M., Wieland, M., & Geis-Gerstorfer, J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2006), 76(2): 323-334.
- SANTOS, L. S.; Francisco, D.E.; Leite, E.; Cogo, S.; Dias-netipanyj, M.; Pinto, S.; Espósito, S.; Popat, K.; Soares, P; Bioactivity and Antibacterial Effects of Ag-Ca-P Doped PEO Titania Coatings. *Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering* (2018), 6: 6-14.
- SENSE Odontologia disponível em <<https://senseodonto.com.br/implante-dentario>> acesso: 28/04/19
- SHIH, Y. H., Lin, C. T., Liu, C. M., Chen, C. C., Chen, C. S., & Ou, K. L. Effect of nano-titanium hydride on formation of multi-nanoporous TiO<sub>2</sub> film on Ti. *Applied Surface Science* (2007), 253(7): 3678-3682.

- SHIN, Ki Ryong, Young Gun Ko, and Dong Hyuk Shin. Effect of electrolyte on surface properties of pure titanium coated by plasma electrolytic oxidation. *Journal of Alloys and Compounds* (2011), 509: S478-S481.
- SHOKOUHFAR, M., & Allahkaram, S. R. Formation mechanism and surface characterization of ceramic composite coatings on pure titanium prepared by micro-arc oxidation in electrolytes containing nanoparticles. *Surface and Coatings Technology* (2016), 291: 396-405.
- SHRESTHA, S. Magnesium and surface engineering. *Surface Engineering* (2010), 26(5): 313-316.
- SKELTON, K. L., Glenn, J. V., Clarke, S. A., Georgiou, G., Valappil, S. P., Knowles, J. C., ... & Jordan, G. R.. Effect of ternary phosphate-based glass compositions on osteoblast and osteoblast-like proliferation, differentiation and death in vitro. *Acta biomaterialia* (2007), 3(4): 563-572.
- SOARES, G.A. Biomateriais. *Forum de Biotecnologia Biomateriais. Programa de engenharia metalúrgica e de materiais. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro* (2005), 84p .
- SOARES, P., Dias-Netipanyj, M. F., Elifio-Esposito, S., Leszczak, V., & Popat, K.. Effects of calcium and phosphorus incorporation on the properties and bioactivity of TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Journal of biomaterials applications* (2018), 33(3): 410-421.
- SOPCHENSKI, L., Popat, K., & Soares, P. Bactericidal activity and cytotoxicity of a zinc doped PEO titanium coating. *Thin Solid Films* (2018a), 660: 477-483.
- SOPCHENSKI, L., Cogo, S., Dias-Netipanyj, M. F., Elifio-Espósito, S., Popat, K. C., & Soares, P.. Bioactive and antibacterial boron doped TiO<sub>2</sub> coating obtained by PEO. *Applied Surface Science* (2018b), 458: 49-58.
- STEIN, G. S., Lian, J. B., & Owen, T. A.. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *The FASEB Journal* (1990), 4(13): 3111-3123.
- SUMINOV, I. V., Epelfeld, A. V., Lyudin, V. B., Krit, B. L., & Borisov, A. M. Microarc oxidation (theory, technology, equipment) (2005).. Ekomet, Moscow.
- TANG, R., Hass, M., Wu, W., Gulde, S., & Nancollas, G. H.. Constant composition dissolution of mixed phases: II. Selective dissolution of calcium phosphates. *Journal of Colloid and Interface Science* (2003), 260(2): 379-384.

- TRUJILLO, Nathan; POPAT, Ketul. Increased adipogenic and decreased chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells on nanowire surfaces. *Materials* (2014), 7(4): 2605-2630.
- VERNE, E., Ferraris, M., & Jana, C.. Pressureless sintering of Bioverit® III/Ti particle biocomposites. *Journal of the European Ceramic Society* (1999), 19(12): 2039-2047.
- XYNOS, I. D., Edgar, A. J., Buttery, L. D., Hench, L. L., & Polak, J. M.. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research* (2001a), 55(2): 151-157.
- XYNOS, I. D., Hukkanen, M. V. J., Batten, J. J., Buttery, L. D., Hench, L. L., & Polak, J. M.. Bioglass® 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcified Tissue International* (2000b), 67(4): 321-329.
- WALSH, F. C., Low, C. T. J., Wood, R. J. K., Stevens, K. T., Archer, J., Poeton, A. R., & Ryder, A. Plasma electrolytic oxidation (PEO) for production of anodised coatings on lightweight metal (Al, Mg, Ti) alloys. *Transactions of the IMF* (2009), 87(3): 122-135.
- WE, M., Ruys, A. J., Swain, M. V., Milthorpe, B. K., & Sorrell, C. C.. Hydroxyapatite-coated metals: interfacial reactions during sintering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2005), 16(2): 101-106.
- WEI, Grace et al. Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in *Drosophila*: common themes?. *Stem Cells* (2000), 18(6): 409-414.
- WEISS, D. S. L., Torres, R. D., Buchner, S., Blunk, S., & Soares, P.. Effect of Ti and Mg dopants on the mechanical properties, solubility, and bioactivity in vitro of a Sr-containing phosphate based glass. *Journal of Non-Crystalline Solids* (2014), 386: 34-38.
- WU, S. D., Zhang, H., Dong, X. D., Ning, C. Y., Fok, A. S., & Wang, Y.. Physicochemical properties and in vitro cytocompatibility of modified titanium surfaces prepared via micro-arc oxidation with different calcium concentrations. *Applied Surface Science* (2015), 329: 347-355.
- WU, W., Tang, R., Haas, M., & Nancollas, G. H.. Constant Composition Dissolution of Mixed Phases: I. Synthetic Calcium Phosphates. *Journal of Colloid and Interface Science* (2001), 244(2): 347-352.

- YEROKHIN, A. L., Nie, X., Leyland, A., Matthews, A., & Dowey, S. J. Plasma electrolysis for surface engineering. *Surface and Coatings Technology* (1999), 122(2-3): 73-93.
- ZHANG, W., Shen, Y., Pan, H., Lin, K., Liu, X., Darvell, B. W., & Huang, W. Effects of strontium in modified biomaterials. *Acta Biomaterialia* (2011), 7(2): 800-808.
- ZHU, X., Kim, K. H., & Jeong, Y. Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial. *Biomaterials* (2001), 22(16): 2199-2206.