

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Escola de Engenharia

**Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais
– PPGE3M**

ROSIANA BONIATTI

**TITÂNIO REVESTIDO COM RECOBRIMENTO DE MATRIZ HÍBRIDA
CONTENDO HIDROXIAPATITA VISANDO A DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Porto Alegre

2016

ROSIANA BONIATTI

**TITÂNIO REVESTIDO COM RECOBRIMENTO DE MATRIZ HÍBRIDA
CONTENDO HIDROXIAPATITA VISANDO A DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalurgia e de Materiais (PPGE3M) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia, modalidade Acadêmica.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais

**Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Célia de Fraga Malfatti (UFRGS)
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosmary Nichele Brandalise (UCS)**

Porto Alegre

2016

**TITÂNIO REVESTIDO COM RECOBRIMENTO DE MATRIZ HÍBRIDA
CONTENDO HIDROXIAPATITA VISANDO A DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Esta tese foi analisada e julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Engenharia, área de concentração Ciência e Tecnologia dos Materiais, sendo aprovada em sua forma final pela orientadora e pela Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação.

Orientadora: Prof^a Dr^a Célia de Fraga Malfatti (UFRGS)

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmary Nichele Brandalise (UCS)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Shigueaki Takimi– Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Denis Jardim Villarinho, Universidade Feevale

Prof. Dr. Roberto Moreira Schroeder – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Dr. Tiago Lemos Menezes – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann

Coordenador do PPGE3M

Dedico esse trabalho à minha
mãe Arlinda (*in memoriam*),
por tudo que ela foi e
tudo que sempre será.
Ao meu querido pai Juarez,
meu irmão Douglas e
ao meu amor Samuel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha mãe Arlinda (*in memoriam*), que sempre me incentivou, ensinando-me a enfrentar os desafios da vida sem nunca desistir, sei do teu orgulho onde estiveres. Ao meu pai, Juarez, que me ensinou que a ética e o respeito ao próximo são as maiores virtudes que alguém pode possuir. Ambos trabalharam muito e abdicaram de seus sonhos para me proporcionar educação e conhecimento, este trabalho é fruto de tudo o que vocês plantaram todos esses anos.

Ao meu irmão Douglas, que sempre me deu seu incentivo e seu abraço.

Ao meu esposo Samuel, sem você sou só desamor e o oposto é sinceramente verdadeiro, meu muito obrigada pela paciência e palavras, tornaste essa minha jornada mais leve por sempre estar ao meu lado, dividindo sonhos e realidades. Aos meus sogros, Ildegard e Remi, pelo incentivo e apoio.

Às minhas orientadoras, profa. Dra. Célia de Fraga Malfatti e profa. Dra. Rosmary N. Brandelise, pela contribuição para o meu crescimento profissional por meio de suas orientações.

À profa. Dra. Patrícia Pranke, do Instituto de Pesquisa com Células-tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS, que gentilmente disponibilizou seu laboratório para a realização de toda caracterização biológica deste trabalho.

À profa. Dra. Daniela Steffens Vergani, também do Instituto de Pesquisa com Células-tronco, pela solicitude e empenho desde o começo na realização das caracterizações biológicas deste trabalho, assim como a grande contribuição na discussão destes resultados.

As minhas queridas amigas: Aline Bandeira Dotta, Ana Claudia Rangel Faria, LÍlian Rossa Beltrami e Tatiana Pacheco Soares Zamboni – amizade “Além do Tempo”, obrigada pelas conversas diárias em qualquer horário, que de alguma maneira sempre alegraram o meu dia-a-dia, tornado os dias alucinados de trabalho mais leves.

Obrigada pela grande troca de conhecimentos científicos e humanos.

Aos colegas do LAPEC e do LPOL pela amizade e pelos momentos de descontração.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade de realizar um doutorado interinstitucional.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Nenhum homem pode entrar no mesmo rio duas vezes, pois quando banhar-se pela segunda vez, não existirá nem o mesmo rio e nem o mesmo homem”.

Heráclito de Éfeso

RESUMO

O titânio comercialmente puro (Ti-Cp) e suas ligas destacam-se como biomateriais metálicos devido a sua biocompatibilidade sendo amplamente utilizados. Buscando aprimorar o sucesso clínico dos implantes de Ti-Cp em longo prazo, é necessário revestir a sua superfície, proporcionando uma eficiente ancoragem mecânica do implante com o tecido ósseo. Dentre os diversos revestimentos superficiais destacam-se os revestimentos híbridos orgânicos-inorgânicos à base de precursores alcóxidos de silício, obtidos via processo sol-gel. Para que ocorra uma satisfatória adesão do revestimento no substrato, precisa-se levar em consideração a natureza e a preparação da superfície metálica antes da aplicação deste revestimento. Na etapa inicial do trabalho, pré-tratamentos superficiais foram propostos previamente à aplicação dos revestimentos buscando aumentar a aderência entre o titânio e este revestimento híbrido. Utilizou-se três diferentes pré-tratamentos na superfície do Ti-Cp: o "piranha" (ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio), o "kroll" (ácido fluorídrico, ácido nítrico e água) e o "hidróxido de sódio". Em sequência, aplicou-se por processo de *dip-coating* sobre as superfícies tratadas, um revestimento híbrido produzido a partir dos precursores alcóxidos de silício tetraetoxisilano (TEOS) e metiltrietoxisilano (MTES), obtido pelo processo de sol-gel. Em uma segunda etapa, sobre a superfície do Ti-Cp com o pré-tratamento superficial que proporcionou uma maior aderência do revestimento híbrido ao titânio, aplicou-se por *dip-coating*, um revestimento híbrido à base de precursores alcóxidos de silício TEOS e MTES com adição de partículas de hidroxiapatita buscando aprimorar a diferenciação celular sobre o revestimento híbrido. O pré-tratamento com o hidróxido de sódio promove o melhor resultado dentre os pré-tratamentos, pois o revestimento híbrido aplicado posteriormente apresenta recobrimento regular e adesão ao substrato de Ti-Cp. Os resultados morfológicos por MEV-FEG mostraram um revestimento híbrido com boa dispersão da hidroxiapatita e um recobrimento regular e adesão ao substrato de Ti-Cp. Nos resultados biológicos Ti-Cp revestido com TEOS/MTES com a presença de partículas de hidroxiapatita obteve uma adesão celular semelhante ao Ti-Cp sem tratamento. Porém este mesmo revestimento não propiciou a proliferação e diferenciação celular. Os resultados indicaram que a combinação de fatores como a sua superfície hidrofóbica (91°) e a presença da hidroxiapatita no revestimento tornou a superfície desorganizada, acarretando em uma superfície com comportamento desfavorável para o desenvolvimento das células-tronco mesenquimais.

Palavras-chave: titânio biomaterial; revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos; TEOS/MTES; diferenciação celular.

ABSTRACT

Commercially pure titanium (cp-Ti) and its alloys stand out among the metallic materials due to their biocompatibility being widely used in biomaterials. In order to improve the clinical success of cp-Ti implants in the long term, it is necessary to coat the surface, providing an efficient mechanical anchoring of the implant with the bone tissue. Among the various surface coatings are the hybrid coatings based on silicon alkoxide precursors, obtained by the sol-gel process, however, considering the nature and the preparation of the metal surface prior to the application of this coating. In the initial stage of the work, surface pre-treatments were proposed prior to the application of the coatings seeking to increase the adhesion between the titanium and this hybrid coating. Three different pretreatments were used on the cp-Ti surface: "piranha" (sulfuric acid and hydrogen peroxide), "kroll" (hydrofluoric acid, nitric acid and water) and "sodium hydroxide". Subsequently, a hybrid coating produced by the tetraethoxysilane silicon (TEOS) and methyltriethoxysilane (MTES) precursors obtained by the sol-gel process was applied by the dip-coating process onto the treated surfaces. In a second step, on the surface of the cp-Ti with the surface pretreatment that gave a greater adhesion of the hybrid coating to the titanium, dip-coating, a hybrid coating based on precursors silicon alkoxides TEOS and MTES with the addition of hydroxyapatite particles to enhance cell differentiation on the hybrid coating. Pretreatment with sodium hydroxide promotes the best result among the pre-treatments, since the hybrid coating applied afterwards presents regular coating and adhesion to the cp-Ti substrate. The morphological results by SEM-FEG showed a hybrid coating with good dispersion of the hydroxyapatite and a regular coating and adhesion to the cp-Ti substrate. In the biological results Ti-Cp coated with TEOS / MTES with the presence of hydroxyapatite particles obtained a cell adhesion similar to Ti-Cp without treatment. However, this same coating did not promote cell proliferation and differentiation. The results indicated that the combination of factors such as its hydrophobic surface (91°) and the presence of the hydroxyapatite encapsulated in the coating rendering the surface disorganized led to a surface with unfavorable behavior for the development of mesenchymal stem cells.

Keywords: titanium biomaterial, organic-inorganic hybrid coatings, TEOS/MTES; cell differentiation.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula molecular do tetraetoxisilano (TEOS). _____	32
Figura 2 - Fórmula molecular do metiltrietoxisilano (MTES). _____	33
Figura 3 - Representação da transição sol-gel -ponto de geleificação. _____	36
Figura 4 - Fluxograma que ilustra, de forma genérica, as rotas para a preparação de alguns produtos via processo sol-gel, seguindo as etapas: a) reação de hidrólise de uma solução com precursores; b) formação do sol; c) geleificação do sol; d) formas de aplicação do sol-gel na superfície de objetos; e) formação de um xerogel; f) formação de um aerogel; g) formação de uma camada densa. _____	36
Figura 5 - Mecanismos simplificados do processo sol-gel: (a) ligação entre as moléculas dos alcóxidos de silício e a camada de hidróxidos presente na superfície do metal; (b) ligação de hidrogênio formadas entre os grupos hidroxila dos silanóis (Si-OH) e as hidroxilas presentes no metal (Me-OH); (c) formação das ligações siloxano e metalosiloxano. _____	39
Figura 6 - Processo <i>dip-coating</i> para a deposição de filmes sol-gel: (a) amostra imersa; (b) retirada da amostra com velocidade controlada; (c) camada de revestimento uniformemente aplicada sobre a amostra. _____	40
Figura 7 – Publicações científicas sobre biomateriais divulgadas a partir de 1975 até 2016. _____	41
Figura 8 - Publicações científicas divulgadas a partir de 1990 até 2016, encontrado no banco de dados do Scopus, utilizando as palavras-chave "biomaterias, titânio e revestimento híbridos". _____	41
Figura 9 -Transições da célula-tronco mesenquimal (CTM) em diversos fenótipos. _	44
Figura 10 - Fluxograma da metodologia utilizada na Etapa 1, com os parâmetros experimentais da síntese do sol, pré-tratamentos superficiais e procedimentos para deposição do revestimento híbrido no Ti-Cp. _____	48
Figura 11 - Fluxograma da metodologia utilizada na Etapa 2, com os parâmetros experimentais da síntese do sol, melhor pré-tratamento escolhido na Etapa 1 e os procedimentos para deposição do revestimento híbrido bioativo no Ti-Cp. ____	53
Figura 12 - Termogramas (a) TGA e (b) DTG do sol TEOS/MTES após hidrólise e do revestimento TEOS/MTES após a cura. _____	62
Figura 13 - Espectros no FTIR: (a) dos precursores alcóxidos de silício TEOS e MTES puros e (b) sol após hidrólise e revestimento após a cura. _____	64
Figura 14 – Mecanismo da reação para o revestimento TEOS/MTES: (a) hidrólise de TEOS e do MTES, (b) reação entre TEOS/MTES no sol (condensação), (c) a reação após a aplicação do sol por <i>dip-coating</i> no substrato, (d) rede formada no filme sobre o substrato metálico após a cura (reticulação). _____	66
Figura 15 - Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG das superfícies dos revestimentos híbridos TEOS/MTES aplicados sobre os substratos submetidos aos diferentes pré-tratamentos: (a) Ti; (b) Ti/P; (c) Ti/K e (d) Ti/N. _____	67

- Figura 16 - Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG e mapeamento por EDS para a superfície das amostras com e sem pré-tratamento, com aplicação do filme híbrido TEOS/MTES: (a) Ti/TM; (b) Ti/K/TM; (c) Ti/P/TM e (d) Ti/N/TM. _____ 70
- Figura 17 - Mapeamento por EDS da superfície das amostras revestidas, após o ensaio de adesão: (a) Ti/TM; (b) Ti/K/TM; (c) Ti/P/TM e (d) Ti/N/TM. _____ 72
- Figura 18 - Mapeamento por EDS das regiões próximas das incisões realizadas no teste de adesão no revestimento híbrido TEOS/MTES: (a)Ti/TM; (b)Ti/K/TM; (c)Ti/P/TM e (d) Ti/N/TM. _____ 73
- Figura 19 – Micrografias por MEV-FEG da seção transversal das amostras com aplicação do revestimento híbrido TEOS/MTES: (a) Ti/TM; (b) Ti/K/TM; (c) Ti/P/TM e (d) Ti/N/TM. _____ 75
- Figura 20 - (a) Monitoramento de OCP e (b) curvas de polarização para as amostras estudadas em solução SBF. _____ 78
- Figura 21 - Distribuição granulométrica da hidroxiapatita em pó. _____ 79
- Figura 22 - Micrografias das partículas de hidroxiapatita obtidas por MEV-FEG com magnificação original de: (a) 10000 x; (b) 50000 x; (c) 250000 x. _____ 80
- Figura 23 - Difração de raios X: (a) hidroxiapatita; (b) hidroxiapatita calcinada a 450 °C. _____ 80
- Figura 24 - Espectros no FTIR da hidroxiapatita em pó e hidroxiapatita em pó calcinada a 450 °C. _____ 81
- Figura 25 - Espectro no FTIR do sol TEOS/MTES com partículas de HA após a hidrólise e após a cura a 450 °C. _____ 83
- Figura 26 - Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG para a superfície das amostras com aplicação do filme híbrido TEOS/MTES com a adição da HA, com magnificação original: (a) 500x; (b) 1000x; (c) 5000x; (d) 10000x. _____ 84
- Figura 27 - Mapeamento por EDS da superfície da amostra com aplicação do filme híbrido TEOS/MTES e adição da HA. _____ 85
- Figura 28 - Micrografias obtidas por MEV-FEG de: (a) topo; (b), (c) seção transversal da superfície da amostra Ti/N/TM/HA onde existem aglomerados de HA e (d) onde não existe a presença de aglomerados de HA. _____ 86
- Figura 29 - Mapeamento por EDS da superfície da amostra com aplicação do filme híbrido TEOS/MTES com a adição da HA, após o ensaio de adesão. _____ 87
- Figura 30- Micrografias obtidas por MEV-FEG do revestimento híbrido bioativo: (a) trilha após o ensaio de adesão (magnificação de 500x) e (b) ampliação do revestimento após o ensaio de adesão (magnificação de 50000x). _____ 88
- Figura 31 - Imagens tridimensionais obtidas por AFM da superfície das amostras estudadas: (a) Ti-Cp; (b) Ti/N/TM; (c) Ti/N/TM/HA. _____ 88
- Figura 32 - Teste de adesão celular sobre a superfície dos grupos revestidos com a presença da hidroxiapatita (Ti/N/TM/HA), grupos revestidos (Ti/N/TM), não revestidos (Ti-Cp) e controle (CTM). _____ 90
- Figura 33 - Viabilidade celular avaliado em 1, 4 e 7 dias após a semeadura celular. Os resultados são apresentados como média±erro padrão. Os asteriscos acima das

barras correspondem a comparações dos diversos grupos entre si.; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$. _____ 91

Figura 34 - Microscopia de fluorescência demonstrando a morfologia das CTMs sobre a superfície dos grupos: (a) controle; (b) Ti-Cp; (c) Ti/N/TM e (d) Ti/N/TM/HA. A magnificação das fotografias da primeira coluna é de 10x e das fotografias da segunda coluna também são de 10x, porém acrescido de zoom digital de 3x. ___ 92

Figura 35 - Teste de toxicidade: dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das células. Os dados são apresentados como média±erro padrão. 93

Figura 36- Ensaio de diferenciação osteogênica sobre as superfícies dos grupos não revestidos (Ti-Cp).e revestidos (Ti/N/TM/HA). Os dados são apresentados como média±erro padrão. _____ 93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química elementar da barra de Ti-Cp grau 2 utilizada na pesquisa. _____	46
Tabela 2 - Informações técnicas dos reagentes utilizados. _____	47
Tabela 3 - Critérios para avaliação de aderência para o revestimento. _____	52
Tabela 4 - Codificação e descrição das amostras estudadas nas Etapas 1 e 2 da pesquisa. _____	54
Tabela 5 - Valores de ângulo de contato superficial médio para as amostras de Ti-Cp e Ti-Cp com os diferentes pré-tratamentos superficiais. _____	68
Tabela 6 – Média das espessuras de camada dos revestimentos a partir das imagens de MEV-FEG. _____	75
Tabela 7 – Rugosidades médias obtidas pela análise de perfilometria. _____	76
Tabela 8 - Ângulo de contato médio medido para as amostras de Ti-Cp pré-tratadas e revestidas com filmes híbridos, em água. _____	77
Tabela 9 - Valores de ângulo de contato superficial e os valores médios de rugosidade obtidos pela análise AFM para as amostras com aplicação do revestimento híbrido TEOS/MTES com hidroxiapatita. _____	89

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
°C.min ⁻¹	Graus Celsius por minuto
µg/mL	Micrograma por mililitros
µm	micrometro
µM	Micromol
3D	Três dimensões
AFM	Microscopia de força atômica
ANOVA	Análise de variância
APTMS	Organosilano aminopropiltrimetoxissilano
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
cm	Centímetro
cm.min ⁻¹	Centímetro por minuto
cP	Centipoise
CTMs	Células-tronco mesenquimais
CVD	Deposição química em fase vapor
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco 'smodified Eagle Medium</i>
DRX	Difração de Raios X
DTG	Termogravimetria Derivada
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada e Fourier
HA	Hidroxiapatita
IPCT	Instituto de Pesquisa com Células-tronco
kV	kilovolts
LDH	Lactato desidrogenase
mA	Miliampère
Me	Metal
mol.L ⁻¹	Mol por litro
MTES	Metiltrietoxilano
OCP	Potencial de circuito aberto
ORMOSIL	<i>Organically Modified Silicates</i>
PAA-NH ₄	Poliacrilato de amônio

PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PVD	Deposição física de vapor
Ra	Rugosidade média
Rrms	Rugosidade quadrática média
s	Segundo
SBF	Solução de fluido corporal simulado
SiO ₂ -P ₂ O ₅ -CaO	Biovidro
TCP	Fosfato tricálcico
TEOS	Tetraetoxisilano
TGA	Análise Termogravimétrica
Ti6Al4V	Liga de titânio- alumínio-vanádio
Ti-Cp	Titânio Comercialmente Puro
WST-8	2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazólio
UCS	Universidade de Caxias do Sul
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1	Biomateriais.....	23
3.2	Titânio como Biomaterial.....	26
3.3	Efeitos das propriedades (físicas, morfológicas e químicas) de superfície dos implantes de titânio.....	27
3.4	Revestimentos superficiais em Ti-Cp Biomaterial.....	29
3.5	Deposição de revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos	30
3.6	Osseointegração.....	42
3.6.1	Células-tronco mesenquimais (CTMs)	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Materiais – Etapa 1 e 2.....	46
4.2	Métodos.....	47
4.2.1	Pré-tratamentos no Ti-Cp da Etapa 1.....	47
4.2.1.1	Preparação da superfície do substrato da Etapa 1	48
4.2.1.2	Pré-tratamentos superficial da Etapa 1.....	48
4.2.1.3	Preparação do revestimento via processo sol-gel da Etapa 1	49
4.2.1.4	Caracterização do sol da Etapa 1	50
4.2.1.5	Caracterização das amostras pré-tratadas e dos revestimentos da Etapa 1	51
4.2.2	Aplicação do revestimento híbrido TEOS/MTES com hidroxiapatita da Etapa 2.....	53
4.2.2.1	Preparação da superfície do substrato da Etapa 2	54

4.2.2.2	Preparação do revestimento via processo sol-gel da Etapa 2.....	54
4.2.2.3	Caracterização das partículas da hidroxiapatita (HA) da Etapa 2.....	55
4.2.2.4	Caracterização do sol com partículas de hidroxiapatita da Etapa 2.....	56
4.2.2.5	Caracterização das amostras com revestimento híbrido bioativo - Etapa 2.....	56
4.3	Caracterização Biológica da Etapa 2.....	57
4.3.1	Obtenção e cultivo das células-tronco mesenquimais (CTMs).....	57
4.3.2	Estudo de biocompatibilidade in vitro.....	57
4.3.2.1	Adesão celular.....	58
4.3.2.2	Análise de viabilidade celular.....	58
4.3.2.3	Morfologia celular.....	58
4.3.2.4	Ensaio de citotoxicidade.....	59
4.3.2.5	Capacidade de diferenciação osteogênica.....	59
4.3.3	Análise estatística.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1	Caracterização do sol - Etapa 1.....	61
5.2	Caracterização das amostras pré-tratadas - Etapa 1.....	66
5.3	Caracterização das superfícies com revestimentos de precursores alcóxidos de silício aplicados após o pré-tratamento – Etapa 1.....	69
5.4	Caracterização das partículas da hidroxiapatita (HA) - Etapa 2.....	79
5.5	Caracterização do sol com partículas de hidroxiapatita - Etapa 2.....	81
5.6	Caracterização das superfícies com o revestimento híbrido com hidroxiapatita - Etapa 2.....	83
5.7	Caracterização biológica.....	90
5.7.1	Estudo de biocompatibilidade in vitro.....	90
5.7.2	Adesão e Viabilidade Celular.....	90
5.7.3	Diferenciação Osteogênica.....	93
6	CONCLUSÃO.....	100

7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	101
8	TRABALHOS PUBLICADOS	102
9	REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

O aumento na qualidade de vida da população tem conseqüentemente proporcionado uma maior expectativa de vida, e isto, em combinação com um estilo de vida mais ativo da população, aumentou significativamente o número de enfermidades, que conseqüentemente ampliou a procura por implantes e recuperação dos tecidos ósseos e articulações (BRAEM et al., 2012). Este fato contribuiu para o desenvolvimento da bioengenharia, que compila conhecimentos de grandes áreas da ciência, como a biologia e a engenharia, visando aplicação na medicina reparadora de tecidos ou órgãos humanos defeituosos ou faltantes, de forma transitória ou permanente. Dentre os avanços científicos na bioengenharia, despontam os chamados biomateriais, utilizados para a confecção de próteses e implantes em substituição e/ou recuperação de ossos e tecidos (HENCH, 1998).

Os biomateriais são materiais desenvolvidos para uso em áreas da saúde com a finalidade de substituir a matéria viva, cuja função está debilitada ou foi perdida. Estes são constituídos por qualquer substância sintética ou natural que pode ser usada como tratamento para substituição total ou parcial de qualquer tecido, órgão ou organismo (CHEN; THOUAS, 2015). Dentre as características essenciais desses materiais estão a biocompatibilidade e a biofuncionalidade com os tecidos (HELMUS; TWEDEN, 1995; CHEN; THOUAS, 2015).

Os biomateriais podem ser de natureza cerâmica, metálica, polimérica e compósitos, atuando de acordo com as necessidades e condições de aplicação no corpo humano (ORÉFICE, 2006).

Dentre os materiais metálicos amplamente utilizados em biomateriais destaca-se o titânio comercialmente puro (Ti-Cp) e suas ligas, devido as suas propriedades mecânicas específicas e excelente biocompatibilidade (CHEN; THOUAS, 2015). Esta biocompatibilidade é atribuída a uma camada passiva de dióxido de titânio (TiO₂) que se forma naturalmente em sua superfície quando em contato com oxigênio na temperatura ambiente. Porém, esta camada não é suficientemente eficaz para proteger o Ti-Cp em alguns ambientes agressivos, devido à sua fina espessura e estrutura porosa, apresentando baixa dureza superficial e baixa resistência ao desgaste, principalmente em se tratando de aplicações em articulações e/ou próteses, que sofrem desgaste,

impacto e atrito constantes (CHEN et al., 2013; CATAURO et al., 2014). Ao mesmo tempo, as superfícies de implantes de titânio e suas ligas podem formar ambientes propícios para a adesão e proliferação bacteriana, beneficiando a formação do chamado biofilme que é, em boa parte, inacessível para o sistema imunológico do corpo humano e resistente à ação de drogas (RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013).

O titânio é considerado um material bioinerte (ISAAC et al., 2010) e a não existência de uma interação natural com o meio biológico de forma a promover uma integração entre tecidos e o titânio, favorece a diminuição do tempo de fixação ao osso causando desestabilização e soltura de seus implantes e próteses (BRAEM et al., 2012). A consequência direta disso é a necessidade de novas cirurgias para revisões ou mesmo substituições do implante, causando desconforto e incômodo ao paciente além de mais custos desnecessários (BRAEM et al., 2012).

Buscando melhorar o sucesso clínico dos implantes de Ti-Cp em longo prazo, é necessário revestir a sua superfície, fornecendo uma melhor e mais rápida ancoragem mecânica do implante com o tecido ósseo (aumento da ligação osso/implante), melhor osteocondutividade, resistência ao desgaste e à corrosão, aumento da biocompatibilidade e da bioatividade e diminuição do tempo de recuperação (cura) depois da implantação (SOBIESZCZYK, 2010; BRAEM et al., 2012; TAN et al., 2013; PRASAD, 2015; HARADA et al., 2016).

Dentre os diversos revestimentos superficiais propostos para modificação da superfície dos implantes metálicos destacam-se os revestimentos híbridos compostos por precursores alcóxidos de silício, obtidos via processo sol-gel.

O processo sol-gel tem sido proposto como um método adequado para aperfeiçoar a biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade (KULKARNI et al., 2014), por meio da formação de um revestimento protetor biocompatível (BALLARRE et al., 2010). Os revestimentos obtidos pelo processo sol-gel possuem algumas vantagens quando comparados a outros métodos, como alto controle de composição, microestrutura e espessura do filme, custos reduzidos uma vez que os precursores usados são líquidos, além de ser possível moldar revestimentos em formas complexas (WANG et al., 2009; MOHSENI et al., 2014-a). A baixa viscosidade final dos sóis preparados permite a utilização do processo *dip-coating* para a deposição dos revestimentos sobre a superfície do substrato metálico. Este processo proporciona uma velocidade controlada de imersão e emersão da amostra no sol-gel, permitindo assim o

controle da espessura do revestimento (MOHSENI et al., 2014-b; ASADI et al., 2014; KUNST et al., 2014; TIAN et al., 2015).

Outra vantagem dos revestimentos híbridos compostos por precursores alcóxidos de silício é a possibilidade de partículas a base de fosfatos de cálcio serem dispersas e adicionadas a esses revestimentos, podendo torná-los bioativos, induzindo assim a osseointegração. Exemplo muito usado é a hidroxiapatita (HA), que é a maior constituinte inorgânica dos ossos e dentes humanos e devido a tal semelhança favorece a interação entre o tecido vivo e o material. Contudo, o uso individual de revestimentos cerâmicos é limitado, pois estudos clínicos mostraram que ao longo prazo ocorre perda de massa óssea e inflamação em torno dos implantes recobertos (ISAAC et al., 2010). Estes problemas são provavelmente resultantes da degradação do revestimento, uma fraca aderência do revestimento de HA à superfície do metal, a baixa cristalinidade da apatita e a não uniformidade da espessura da camada de apatita depositada (ISAAC et al., 2010).

Diante do exposto, torna-se promissor o emprego de revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos com hidroxiapatita, buscando favorecer a adesão e proliferação celular, promovendo assim a Osseointegração em implantes de titânio. Dessa maneira pode-se pelo menos minimizar ou postergar efeitos negativos no corpo humano, tais como possíveis reações inflamatórias e alérgicas além de cirurgias para revisões ou mesmo substituições do implante devido a sua soltura.

Nesse contexto, no presente trabalho, tem-se como objetivo obter revestimentos compósitos de matriz híbrida com os precursores tetraetoxisilano (TEOS) e metiltrietoxilano (MTES) contendo hidroxiapatita sobre titânio, via processo sol-gel, para proteger o substrato da corrosão causada pelos fluídos corpóreos e promover uma superfície de ambiente propício para a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é promover a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais sobre superfície do titânio comercialmente puro (Ti-Cp) utilizado como um biomaterial, por meio da aplicação de um revestimento híbrido à base de precursores alcóxidos de silício, obtendo um revestimento que aprimore a osseointegração.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a influência de diferentes pré-tratamentos (kroll, piranha e NaOH) em substrato de titânio, para posterior aplicação do revestimento híbrido composto de precursores alcóxidos de silício, avaliando a adesão e integridade do revestimento, bem como a proteção do substrato metálico da ação da corrosão;
- Analisar a influência da adição de hidroxiapatita no sol e na formação do revestimento híbrido composto pelos precursores alcóxidos de silício tetraetoxisilano (TEOS) e metiltrietoxilano (MTES);
- Estudar a biocompatibilidade *in vitro* por meio dos resultados obtidos de adesão, viabilidade, morfologia, citotoxicidade e diferenciação celular, comparando o titânio comercialmente puro em relação ao titânio com revestimento híbrido TEOS/MTES com e sem a adição de hidroxiapatita.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Biomateriais

O campo de biomateriais tornou-se uma área vital de pesquisa, uma vez que estes materiais podem melhorar a qualidade e a longevidade de vida dos seres humanos (GEETHA et al., 2009).

Um biomaterial é qualquer substância (que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou de origem natural, que é empregado para substituir, auxiliar ou restaurar de forma completa ou parcial, órgãos, tecidos ou funções do corpo humano, perdidos ou debilitados (CHEN; THOUAS, 2015). Os mesmos podem ser de natureza cerâmica, metálica, polimérica ou na forma de compósitos, atuando de acordo com as necessidades e condições de aplicação no corpo humano (ORÉFICE, 2006).

Os biomateriais para implantes e próteses devem substituir os tecidos ou articulações para que os mesmos voltem a ter a sua funcionalidade natural. Portanto, precisam interagir de forma adequada com o ambiente biológico, vinculando-se fisiologicamente com os tecidos corporais circundantes (FERRARIS et al., 2014). Para que isso ocorra, é necessário que eles apresentem algumas características importantes, das quais se destacam: a biocompatibilidade e a biofuncionalidade.

A biocompatibilidade de um material depende principalmente da reação do corpo humano ao implante e pode ser enunciada como a aceitação de um implante artificial pelos tecidos circundantes e pelo corpo como um inteiro (CHEN; THOUAS, 2015). A biocompatibilidade abrange todos os aspectos da função do biodispositivo, incluindo a interação de células, tecidos e órgãos com os biomateriais implantados.

Os requisitos para que um material que compõe um implante possa ser considerado biocompatível são complexos e rigorosos, variando conforme as aplicações médicas específicas (GEETHA et al., 2009; FERRARIS et al., 2014). O implante deverá ser composto de elementos não tóxicos e, por conseguinte, que não provoque reações inflamatórias ou alérgicas no corpo humano, podendo ser mantido por um longo período em função. Ao mesmo tempo, deve proporcionar a osseointegração e ser resistente à corrosão (GEETHA et al., 2009; FERRARIS et al., 2014; CHEN; THOUAS, 2015).

Além da biocompatibilidade, os biomateriais devem possuir biofuncionalidade, sendo esta, a habilidade de satisfazer apropriadamente a função desejada em um

hospedeiro específico. Neste caso os biomateriais devem apresentar características mecânicas, físicas e químicas que atendam exigências severas do organismo (GEETHA et al., 2009).

Como os biomateriais podem ser usados em implantes permanentes no corpo humano ou como um suporte temporário de células e tecidos, as suas superfícies devem prover de sinais químicos e físicos que guiem a diferenciação e agrupamento de células para formarem tecidos biofuncionais (DIENER et al., 2005).

De acordo com o retorno biológico induzido no organismo, os materiais chamados biocompatíveis podem ser classificados como (VALLET-REGI, 1997):

- Incompatíveis: ocorre a liberação de substâncias tóxicas em concentrações maiores que as toleradas pelo organismo e que conduzem a efeitos nocivos ao corpo, podendo acarretar em uma rejeição do implante;
- Biotoleráveis: materiais aceitos pelo organismo, sendo isolados pelo tecido hospedeiro através da formação de uma camada envoltória constituída por um tecido fibroso, induzida por meio de liberação de compostos químicos, íons, óxido do material, e outros, por parte do material implantado. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos ou em sua maioria metais;
- Bioinertes: materiais quimicamente estáveis e também tolerados pelo organismo, mas neste caso a formação do tecido fibroso é mínima. O material não libera nenhum tipo de componente via ação dos fluídos corpóreos, ou mais realisticamente, em quantidades mínimas, não provocando reações adversas no organismo. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, carbono e titânio e suas ligas;
- Bioativos: materiais que favorecem as ligações da natureza química entre o material implantado e o tecido ósseo (osseointegração), sem a formação de invólucros fibrosos.
- Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a estes materiais, permitindo a osteocondução através do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais utilizados são os vidros, vitro-cerâmicas a base de fosfato de cálcio e a hidroxiapatita.

- Reabsorvíveis/Biodegradáveis: materiais que após certo período de tempo em contato com os tecidos acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Esses materiais, como por exemplo, o fosfato tricálcico (TCP), são importantes em aplicações clínicas em função de serem desnecessárias novas intervenções cirúrgicas para a retirada do material implantado.

A concepção e a seleção de um biomaterial dependem da sua aplicação médica específica. Dentre os biomateriais, os materiais metálicos são muito empregados e entre os mais utilizados, podemos destacar os aços inoxidáveis (principalmente os austeníticos como, por exemplo, o 316 L), as ligas de cobalto-cromo-molibdênio (Co-Cr-Mo) e cobalto-níquel-cromo-molibdênio (Co-Ni-Cr-Mo), titânio puro e suas ligas como, por exemplo, a titânio- alumínio-vanádio (Ti6Al4V) (CHEN; THOUAS, 2015).

A fim de servir de forma segura e apropriada durante um longo período de tempo sem rejeição, um implante metálico deve possuir algumas características (alguns requisitos) essenciais (LEYENS et al., 2003; CHEN; THOUAS, 2015):

- biocompatibilidade (não tóxico);
- biofuncionalidade;
- alta resistência à corrosão e ao desgaste (para manter as propriedades mecânicas e impedir a degradação do material frente aos fluídos corporais);
- textura de superfície compatível com a adesão celular;
- Osseointegração (bioadesão);
- propriedades mecânicas favoráveis (por exemplo, Módulo de Young e resistência à fadiga semelhante à do osso ou de acordo com a aplicação a que se destinam);
- capacidade de processamento (conformação, usinagem, etc);
- disponibilidade (preços acessíveis);

Por atender a estas exigências, os materiais metálicos têm predominado nas cirurgias vasculares (como *stents*), aparelhos ortopédicos, incluindo dispositivos temporários (placas ósseas, pinos e parafusos) e implantes permanentes (próteses inteiras). Ao mesmo tempo, os metais também possuem aplicações na prática odontológica e ortodôntica, incluindo obturações dentárias (CHEN; THOUAS, 2015). A elevada resistência mecânica de alguns metais é uma das propriedades que os

diferenciam dos outros materiais além da possibilidade de aplicação de diversos métodos de esterilização em suas superfícies (BUDDY et al., 1996).

O desafio para o futuro dos biomateriais se dará pela procura por biomateriais bioativos que combinam tipo de superfície, porosidade e sua capacidade de interagir com fatores biológicos (ARCOS et al., 2014).

3.2 Titânio como Biomaterial

O titânio comercialmente puro (Ti-Cp) apresenta teores de pureza que estão entre 98 a 99,5%. O Ti-Cp pode ser classificado em quatro diferentes graus e suas propriedades físicas variam de acordo com a quantidade de elementos presentes, que são considerados impurezas de elementos residuais ao processo de purificação (NIINOMI, 1998). Essas impurezas tais como: oxigênio, ferro, nitrogênio, carbono e hidrogênio, aumentam de acordo com a elevação de grau (NIINOMI, 1998).

Na área biomédica, titânio e suas ligas agregam a maior quantidade de requisitos para utilização em cirurgias e também são chamados de "metais especiais" (PFEIFFER et al., 2003). Seu amplo uso é consequência das suas propriedades tais como: baixa densidade, não toxicidade, excelente biocompatibilidade, propriedades mecânicas superiores, como relativo baixo módulo de elasticidade em comparação com outros metais, boa resistência à fadiga, maleabilidade, formabilidade e resistência à corrosão em meios fisiológicos, além de ser inerte, ou seja, não libera íons que possam reagir com moléculas orgânicas (IIJIMA et al., 2003; SOBIESZCZYK, 2010; ISAAC et al., 2010; AJAMI et al., 2012; CHEN et al., 2013; TAN et al., 2013; MOHSENI et al., 2014-a; ZHENG et al., 2014; CHEN; THOUAS, 2015; HARADA et al., 2016).

A velocidade de oxidação do titânio depende das condições do meio e pode ocorrer em duas condições: em anaerobiose, onde a água é o agente de oxidação e em aerobiose, onde o oxigênio é o agente de oxidação (DIENER et al., 2005). Sua biocompatibilidade é atribuída a uma camada passiva de dióxido de titânio (TiO₂) que se forma naturalmente em sua superfície quando em contato com oxigênio na temperatura ambiente. Quando implantado, o titânio é protegido por uma camada de óxido densa e passiva com baixa solubilidade e reatividade a moléculas orgânicas, ou seja, esta camada é inerte, estável e age também como barreira protetora contra a dissolução iônica (TENGVALL et al., 1992; DUBRUEL et al., 2006; PARK et al., 2012).

Devido às propriedades apresentadas, o titânio tem sido amplamente utilizado como material em uma extensa variedade de dispositivos biomédicos, tais como implantes e/ou prótese ortopédicas e dentárias (DUBRUEL et al., 2006; KANG et al., 2010; PARK et al., 2012). Exemplos de seu uso incluem implantes para substituição total de quadril, fixação e substituições ósseas ou articulares, cliques cirúrgicos, *pacemakers*, implantes dentários, *stents* ou componentes de válvulas cardiovasculares, entre outros (DUBRUEL et al., 2006; EGUSA et al., 2008; JOKANOVIC et al., 2014).

3.3 Efeitos das propriedades (físicas, morfológicas e químicas) de superfície dos implantes de titânio

O titânio é amplamente utilizado como biomaterial devido à sua elevada citocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, possibilitando o contato direto entre osso-implante (CARVALHO et al., 2010). Porém, o titânio é classificado como bioinerte, ou seja, ocorre uma falta de integração dos seus implantes com o meio ambiente circundante e desta forma o organismo reconhece o titânio como um corpo estranho e o isola através da formação de uma camada fibrosa tornando-o inerte ao organismo (ISAAC et al., 2010; SOBIESZCZYK, 2010; SOUZA et al., 2010; TAN et al., 2013).

As propriedades superficiais do implante controlam a quantidade e a qualidade da adesão celular sobre o mesmo e, por conseguinte sobre o crescimento do tecido. Estudos evidenciaram que composição, rugosidade, energia de superfície, carga eletrostática e tensão superficial de substratos de titânio afetam as propriedades celulares como morfologia, adesão, proliferação e diferenciação (ZHU et al., 2004; WANG et al., 2013).

É importante controlar a rugosidade na superfície de um implante, pois sabe-se que osteoblastos humanos se aderem melhor a superfícies rugosas do que lisas, sendo que adesão normalmente aumenta em superfícies com rugosidade média (Ra) em torno de 1 μm (ZHU et al., 2004). Ainda, a rugosidade da superfície deve ser avaliada não apenas em termos de amplitude, mas também de organização, pois superfícies de titânio desordenadas geram no substrato baixa adesão e proliferação celular, este fato pode estar relacionado à presença de irregularidades na superfície, o que dificulta a formação de uma área de contato adequada entre a célula e o substrato (WIELAND et al., 2002; PFEIFFER et al., 2003).

Com relação à molhabilidade superficial, a mesma é determinante para a adsorção de proteínas e para a adesão celular. Estudos demonstram que as células se aderem em maior quantidade sobre superfícies hidrofílicas (PONSONNET et al., 2003).

Estudos também apresentam que ranhuras superficiais de baixa amplitude, induzem a orientação de grupos ou células individuais ao longo do seu eixo, levando os autores a acreditarem que o parâmetro mais eficiente para a orientação das células é a largura dos sulcos e não a sua profundidade. Portanto, osteoblastos orientados tendem a mineralizar de maneira mais rápida, beneficiando o processo de Osseointegração tecido/implante (WIELAND et al., 2002; PFEIFFER et al., 2003).

Dentro deste contexto é importante destacar que um aspecto fundamental na interação dos precursores alcóxidos de silício com os substratos metálicos é a natureza e a preparação da sua superfície (VAN OOIJ et al., 2005).

As ligações siloxano (Si-O-Si) e metalosiloxano (Me-O-Si) são responsáveis pela conexão entre o revestimento e o substrato. Para garantir esta interação, a superfície necessita estar limpa e tratada (química e/ou mecanicamente), reativando os grupos hidroxila (OH), responsáveis pela ligação de hidrogênio ocorrida na adesão (AQUINO, 2006).

Os pré-tratamentos superficiais tem como objetivo favorecer a reativação dos grupos OH aumentando a ligação do silano com o substrato, além de remover algumas contaminações presentes, tais como óxidos, graxas, óleos e quaisquer outras sujidades que possam interferir no processo de adesão metal/silano. Sendo assim, o preparo da superfície metálica pode ser feito por meio de uma limpeza com solventes, tratamentos químicos ou mecânicos.

Os tratamentos químicos podem ser realizados com ácidos e bases. Em condições ambientes, os óxidos nas superfícies do metal são geralmente hidróxidos, portanto a hidroxila pode reagir tanto com um ácido como com uma base. Dentre as diversas soluções que reativam a superfície destacam-se os ataques ácidos como a solução "piranha", composta por ácido sulfúrico (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a solução "Kroll" composta por ácido nítrico (HNO_3) e ácido fluorídrico (HF), e o ataque alcalino com solução composta pelo hidróxido de sódio (NaOH).

A solução piranha promove uma oxidação química da superfície, que removerá materiais orgânicos, além de adicionar/liberar o grupo funcional hidroxila na superfície do Ti (RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013). Já a solução kroll, é utilizada para remover o

óxido nativo e contaminações da superfície, tornando-a limpa e uniforme (SOBIESZCZYK, 2010; LIU et al., 2004). O pré-tratamento alcalino com NaOH, à temperatura ambiente em metais, acarreta na remoção de impurezas superficiais, além de proporcionar o aumento da concentração de hidroxilas na superfície metálica, o que a torna mais ativa (ZHU, 2005; VAN OOIJ et al., 2005; DEFLORIAN et al., 2006).

Com estes conhecimentos, é possível modificar as propriedades das superfícies dos implantes de titânio e aperfeiçoar a sua biocompatibilidade, com o intuito de utilizá-lo como biomaterial e de aumentar a sua estabilidade em longo prazo (VOJTĚCH et al., 2010; FU et al., 2012).

3.4 Revestimentos superficiais em Ti-Cp Biomaterial

Segundo alguns autores, o Ti-Cp sem tratamento superficial pode causar alguns problemas quando implantados no corpo. Braem et al. (2012) argumentaram que a inexistência de uma interação natural com o meio biológico, de forma a promover uma integração entre tecidos e o titânio, pode diminuir o tempo de fixação ao osso causando desestabilização e soltura de implantes e próteses de titânio. A consequência direta disso é a necessidade de novas cirurgias para revisões ou mesmo substituições do implante, causando desconforto e incômodo ao paciente além de mais custos desnecessários. Mohseni et al. (2014-b) e Egusa et al. (2008) apresentaram relatos de reações inflamatórias no entorno de implantes com formação de um tecido fibroso avascular, encapsulando esses implantes. Catauro et al. (2014) e Chen et al. (2013) argumentaram que a camada passiva de dióxido de titânio (TiO_2) não é suficientemente eficaz para proteger o Ti-Cp em alguns ambientes agressivos, devido à sua fina espessura e estrutura porosa, apresentando baixa dureza superficial e baixa resistência ao desgaste, principalmente em se tratando de aplicações em articulações e/ou próteses, que sofrem desgaste, impacto e atrito constante. Rodríguez-Cano et al. (2013) demonstraram que as superfícies de implantes de titânio e suas ligas podem formar ambientes propícios para a adesão e proliferação bacteriana, beneficiando a formação do chamado biofilme que é, em boa parte, inacessível para o sistema imunológico e resistente a ação de drogas.

Buscando melhorar o sucesso clínico dos implantes de Ti em longo prazo, é necessário revestir a sua superfície, fornecendo uma melhor e mais rápida ancoragem mecânica do implante com o tecido ósseo (aumento da ligação osso/implante), melhor

osteocondutividade, resistência ao desgaste e à corrosão, aumento da biocompatibilidade e da bioatividade e diminuição do tempo de recuperação (cura) depois da implantação (SOBIESZCZYK, 2010; BRAEM et al., 2012; TAN et al., 2013; PRASAD, 2015; HARADA et al., 2016).

Alguns dos tratamentos superficiais mais utilizados são as técnicas para a deposição de revestimentos sobre metais, tais como: a deposição física de vapor (PVD), a deposição química em fase vapor (CVD), a deposição eletroquímica, pulverização por plasma e processo de sol-gel (WANG et al., 2009), sendo este último um dos mais difundidos para aperfeiçoar a biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade (KULKARNI et al., 2014).

3.5 Deposição de revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos

Quando um cirurgião precisa escolher um material para um implante permanente seja ortopédico ou odontológico, as propriedades mecânicas específicas para cada caso são relevantes. Também é importante analisar a toxicidade ou as reações do implante com o tecido circundante. Os metais são os materiais mais utilizados que atendem os requisitos de baixa toxicidade e boas propriedades mecânicas, no entanto, não desenvolvem uma ligação química com o osso, o que pode terminar na remoção do implante (BALLARRE et al., 2007).

Neste contexto, os revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos à base de precursores alcóxidos de silício surgem como alternativa para o recobrimento de materiais metálicos. A utilização desses revestimentos tem sido mencionada para a proteção e biofuncionalização de diversos substratos metálicos, tais como Ti e sua liga Ti6Al4V (VAN OOIJ et al., 2005; WANG et al., 2009; RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013) e o aço AISI 316L (BALARRE et al., 2010; BALARRE et al., 2011; WANG et al., 2013).

Conceitualmente, revestimentos são coberturas ou filmes distribuídos sobre qualquer superfície, com a finalidade de protegê-la ou decorá-la. Revestimentos híbridos são constituídos por uma combinação de componentes orgânicos e inorgânicos que, geralmente, demonstram propriedades complementares resultantes da combinação de seus componentes, concebendo um novo material com propriedades físico-químicas

diferentes daquelas que lhe deram origem (JOSE et al., 2005; BENVENUTTI et al., 2009).

Os revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos reúnem a estabilidade química, mecânica, térmica e boa compatibilidade com superfícies metálicas da fase inorgânica (cerâmica) com as propriedades elásticas e hidrofóbicas da fase orgânica que proporciona maior flexibilidade ao revestimento, reduzindo a formação de trincas durante a remoção do solvente ou por ação mecânica e também melhora a adesão ao substrato (ATANACIO et al., 2005; JOSE et al., 2005; ZHELUDKEVICH et al., 2005; ZAND; MAHDAVAN, 2009; GABBARDO, 2014). Ademais, existe também sinergismo envolvido nas propriedades dos materiais híbridos orgânico-inorgânicos, que depende da natureza química da interface orgânica-inorgânica, da quantidade e da morfologia de cada fase (JOSE et al., 2005; BENVENUTTI et al., 2009).

Desta maneira, estes revestimentos ganharam interesse na área biomédica, pois cada componente pode complementar os recursos uns dos outros, incluindo propriedades mecânicas, propriedades biológicas e hidrofobicidade (OWENS et al., 2016). Esses revestimentos também são vantajosos, pois permitem a incorporação de materiais cerâmicos bioativos, que tornam a película formada sobre o substrato não somente protetora contra corrosão, mas também favorecedora da regeneração óssea, transformando-a numa película biocompatível, proporcionando a osseointegração (Ballarre et al., 2013).

Os alcóxidos de silício, às vezes chamados de “silanos”, são normalmente utilizados como precursores no desenvolvimento de revestimentos híbridos. Os alcóxidos apresentam fórmula geral $M_{4-x}(OR)_x$, onde $x=1-4$ e M representa elementos formadores de rede, tais com: silício, alumínio, zircônio, titânio, ferro, entre outros. Os alcóxidos podem ser obtidos comercialmente ou podem ser preparados via diferentes rotas sintéticas (ALFAYA; KUBOTA, 2002). Estas espécies podem ser solubilizadas em solventes orgânicos, principalmente nos álcoois correspondentes R-OH (onde R representa um grupo alquila), além de apresentarem alta susceptibilidade à hidrólise (WANG; BIERWAGEN, 2009; GABBARDO, 2014).

Os trialcóxissilanos ($x=3$) são utilizados como modificadores de rede para melhorar propriedades específicas, como a hidrofobicidade, a reatividade e a flexibilidade na rede inorgânica. Estes precursores podem ser polimerizados sozinhos

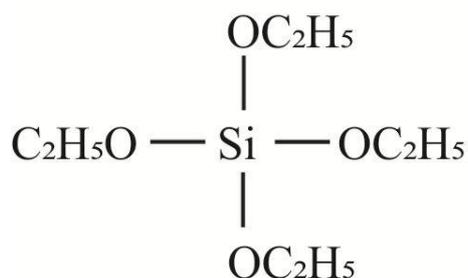
ou preferencialmente com tetraalcoxissilanos ($x=4$), os quais melhoram a conectividade da rede e a estabilidade do sólido final (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

Embora se possa exercer o controle das reações de hidrólise e condensação de forma a promover uma distribuição homogênea do modificador de rede na matriz, nem sempre isso ocorre. Por exemplo, quando trialcoxissilanos são polimerizados sem a adição de qualquer outro formador de rede, acredita-se que o grupo orgânico se localize na superfície e não homogeneamente pela matriz (ALFAYA; KUBOTA, 2002). Por isso torna-se importante a formação de híbridos, pois os mesmos combinam as suas propriedades químicas orgânicas e inorgânicas para a formação de novos materiais.

Existem vários alcóxidos de silício comumente utilizados como precursores na formação de revestimentos híbridos. Dentre estes, destacam-se o tetraetilortosilicato ou tetraetoxissilano (TEOS) e o metiltrietoxissilano (MTES), muito estudados como revestimento protetivo e de ancoragem em substratos metálicos.

O TEOS é considerado um tetraalcoxissilano e precursor inorgânico, e tem como metal o silício e quatro grupos etóxi (ou etóxido) hidrolisáveis, e sua estrutura molecular é apresentada na Figura 1. Por ser facilmente hidrolisável, pode vir a formar completamente as ligações silanol (Si-OH) para, subsequentemente, condensar-se em ligações siloxano (Si-O-Si). O TEOS é tido como um agente *cross-linker*, devido ao fato de promover a formação de redes robustas com reatividade moderada (OWENS et al., 2016).

Figura 1 - Fórmula molecular do tetraetoxissilano (TEOS).



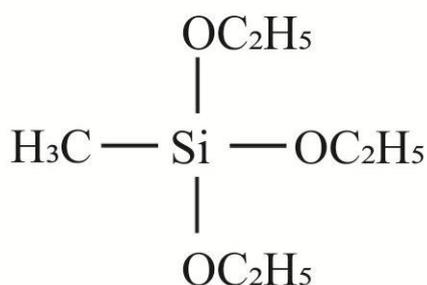
Fonte: Sigma-Aldrich, 2014.

Kros et al. (2002) demonstraram em seu estudo que materiais à base de TEOS, produzidos por sol-gel, podem ser empregados como revestimentos biocompatíveis e são atóxicos.

No entanto, estudos mostraram que a rede reticulada formada a partir do TEOS é puramente inorgânica, precisando assim da combinação com outro composto (normalmente outro alcóxido de silício) para a formação de um híbrido, a fim de melhorar a características e propriedades finais do revestimento (DALMORO et al., 2012); MOTTE et al., 2012). Um dos precursores orgânicos proposto para a formação híbrida com o precursor inorgânico TEOS é o metiltrietoxissilano (MTES) (FIGUEIRA et al., 2015).

O MTES, considerado um trialcoxissilano e precursor orgânico, apresenta apenas três grupos alcóxidos e um grupo orgânico (metil) ligado ao silício, como pode ser visualizado em sua estrutura molecular apresentada na Figura 2. Esta estrutura confere propriedades hidrofóbicas aos revestimentos.

Figura 2 - Fórmula molecular do metiltrietoxissilano (MTES).



Fonte: Sigma-Aldrich, 2014.

Os trialcóxidos de silício combinados com os tetralcóxidos de silício dão origem a uma classe de materiais híbridos conhecidos como ORMOSIL (*Organically Modified Silicates*) (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

Como mencionado anteriormente, revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos obtidos via processo sol-gel, têm sido estudados com o propósito de utilização em revestimentos de biomateriais (BRINKER et al., 1990; OWENS et al., 2016), mais especificamente, muitos destes revestimentos estão sendo utilizados para aprimorar o desempenho contra corrosão de próteses metálicas, ou funcionalizar as superfícies das mesmas, por meio da incorporação de partículas cerâmicas bioativas ou biomoléculas, fármacos e ou componentes orgânicos dispersos em precursores alcóxidos de silício que induzam o processo de Osseointegração desses biomateriais quando implantados no

corpo (BALLARRE et al., 2007; BALLARRE et al., 2011; RAKMAE et al., 2012; RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013; OWENS et al., 2016).

García et al. (2004), desenvolveram e a caracterizaram diversos revestimentos híbridos obtidos por meio da técnica sol-gel, formados por TEOS e MTES com razão molar 40:60, contendo partículas de biovidro ($\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$). A solução sol que apresentou viscosidade de 2,4 cP, foi aplicado pela técnica *dip-coating* sobre o aço inoxidável AISI 316L, utilizado em cirurgias ortopédicas, para reduzir a corrosão do metal e reações adversas quando o mesmo for implantado. Os autores evidenciaram que foi possível depositar o revestimento híbrido, com espessura em torno de 1 μm isento de defeitos, para posterior deposição contendo partículas bioativas sobre esse aço, e concluíram que os dois tipos de partículas mostraram sinais bioativos uma vez que induziram a formação de uma película de hidroxiapatita após algum tempo de imersão em SBF (solução de fluido corporal simulado).

Ballarre et al. (2010), relataram o desempenho *in vitro e in vivo* do aço inoxidável AISI 316L revestido por um filme híbrido obtido via processo sol-gel, composto por TEOS/MTES e TEOS/MTES com a adição de 10 e 30%, de partículas de biovidro ($\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$). A adição dessas partículas formou revestimentos mais espessos, sendo que o filme formado somente com os híbridos TEOS/MTES apresentou espessura de 1,6 μm e os filmes com a adição de 10 e 30% de partículas cerâmicas apresentaram espessuras de filmes de 2,1 e 2,3 μm , respectivamente. Os ensaios *in vitro* mostraram que o revestimento contendo as partículas cerâmicas apresentou melhores propriedades de Osseointegração, devido ao aparecimento de cristais de hidroxiapatita após 30 dias de imersão em SBF. Observaram também em ensaios *in vivo* que o revestimento com menor quantidade de sílica proporcionou a formação de cristais de melhor qualidade, o que conduziu a propriedades mecânicas semelhantes ao osso cortical.

Ballarre et al. (2013) avaliaram o desempenho *in vitro* de amostras de aço inoxidável AISI 316L sem revestimento algum, com revestimento híbrido composto por TEOS e MTES e com um revestimento de camada dupla composto por TEOS/MTES e TEOS/MTES com a adição de 10% de partículas colidais de cerâmica. Os ensaios *in vitro* mostraram que os implantes sem revestimentos originaram uma fina camada óssea no início do processo de integração óssea e, em seguida, esta camada foi separada da superfície com o tempo. Em contrapartida, os revestimentos híbridos sem partículas de

cerâmica geraram novo osso em torno do implante, com alta concentração de cálcio (Ca) e fósforo (P) na interface implante/tecido. Este fato pareceu estar relacionado com a presença de nanopartículas de sílica que compõe a camada. E por último, a adição de partículas bioativas promoveu e melhorou a qualidade do osso com um teor homogêneo de Ca e P, e com uma resistência mecânica semelhante ao de um osso jovem.

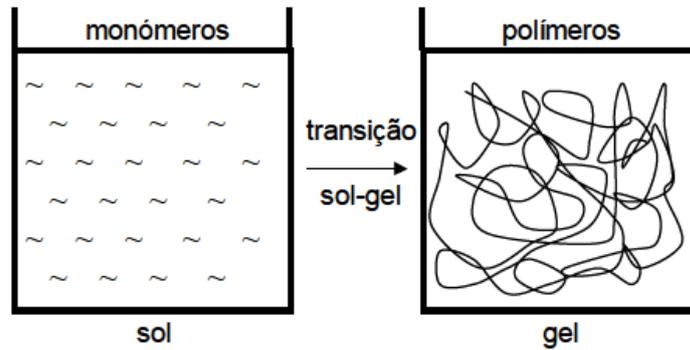
Rodríguez-Cano et al. (2013) apresentaram em seu estudo, a utilização de um pré-tratamento com solução Piranha (1:1 v/v H₂SO₄:H₂O₂) à temperatura de 45°C com tempo de imersão de 30 minutos, para posterior aplicação do organossilano aminopropiltrimetoxissilano (APTMS), promovendo assim a oxidação química da superfície de Ti6Al4V. Os autores confirmaram que a utilização deste pré-tratamento promoveu a formação de hidroxilas suficientes no substrato metálico garantindo a ocorrência de ligações siloxano na reação com o organossilano APTMS. O desempenho biológico do revestimento pelo comportamento de osteoblastos primários mostrou a adesão de bactérias e a formação do biofilme na superfície do substrato tratado. Os autores concluíram que a superfície revestida demonstrou comportamento biocompatível com as células de osteoblastos, responsáveis pela formação de um novo osso em torno de implantes ortopédicos, visto que houve ataque e a proliferação dessas na superfície do substrato metálico, independente das propriedades físico-químicas do mesmo. A superfície tratada com silano reduziu a formação do biofilme se comparada com a superfície pré-tratada pelo processo de oxidação química.

Os revestimentos híbridos orgânico-inorgânicos à base de precursores alcóxidos de silício podem ser preparados via processo sol-gel, sendo umas das suas principais vias de obtenção. O processo ou método sol-gel refere-se a qualquer rota de síntese de materiais onde num determinado momento ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

Como o termo implica, um sol (*solids on liquids*) é empregado para definir uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estável em um fluido, enquanto o termo gel pode ser visto como sendo um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico), rede reticulada, que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios (ALFAYA; KUBOTA, 2002). Após a formação das ligações químicas do processo sol-gel, o sol é caracterizado por uma viscosidade mais baixa até gelificar. A passagem do sol a gel (Figura 3)

corresponde a um aumento abrupto da viscosidade e é denominado ponto de geleificação (KUNST, 2015).

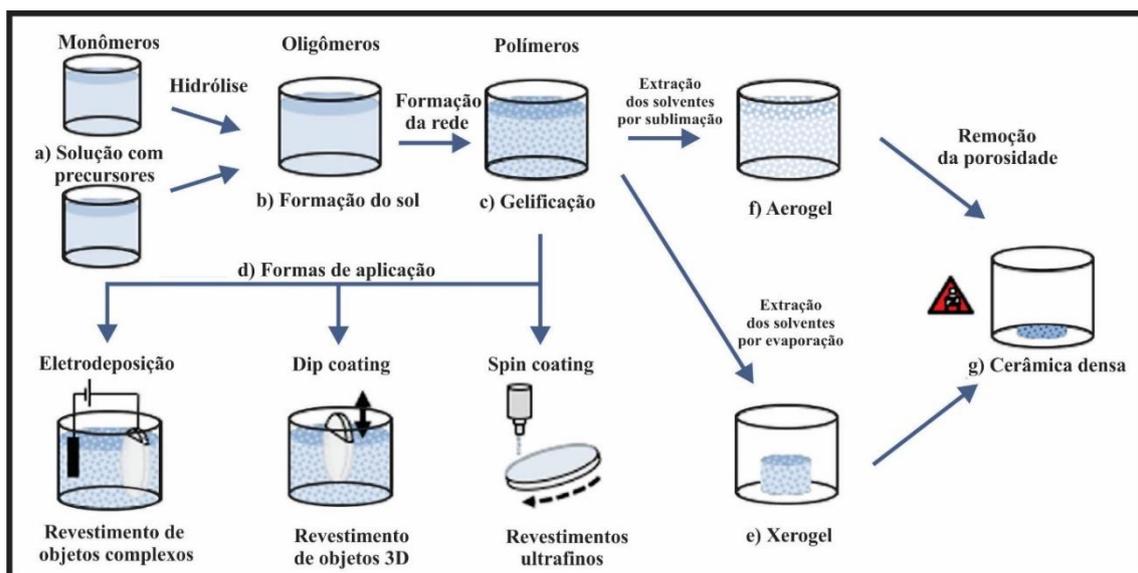
Figura 3 - Representação da transição sol-gel -ponto de geleificação.



Fonte: Adaptado de KUNST, 2015.

A Figura 4 apresenta um esquema que ilustra uma síntese do processo sol-gel de forma genérica, e dependendo da aplicação específica, as diferentes fases ilustradas podem ser prolongadas, alteradas ou removidas (OWENS et al., 2016).

Figura 4 - Fluxograma que ilustra, de forma genérica, as rotas para a preparação de alguns produtos via processo sol-gel, seguindo as etapas: a) reação de hidrólise de uma solução com precursores; b) formação do sol; c) geleificação do sol; d) formas de aplicação do sol-gel na superfície de objetos; e) formação de um xerogel; f) formação de um aerogel; g) formação de uma camada densa.

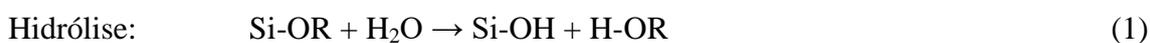


Fonte: Adaptado de OWENS et al., 2016.

A solução precursora (Figura 4-a) sofre reação de hidrólise, o que permite a formação de partículas de tamanho coloidal (sol) (Figura 4-b), após, ocorre à formação da rede tridimensional dessas partículas, ocasionando a geleificação desse sol (Figura 4-c). A hidrólise é a principal reação que conduz a transformação de precursores alcóxidos, quando reagem com a molécula de água. Esta reação acontece a partir da substituição das ramificações OR do precursor alcóxido (onde R é identificado como um grupo orgânico) por um grupo hidroxila (OH), formando grupos silanóis (Si-OH), de acordo com o apresentado na Equação 1. O mecanismo de hidrólise de um precursor alcóxido é complexo, sendo fortemente afetado por vários fatores tais como a razão de solventes utilizada, a temperatura, o pH e a agitação do sistema, entre outros. Imediatamente após a hidrólise, acontecem as reações de condensação entre os grupos silanóis, criando uma rede de ligações siloxano (Si-O-Si), conforme apresentado na Equação 2. Nesse estágio o sol-gel pode ser aplicado na superfície de objetos de diversas formas (Figura 4-d), tais como: eletrodeposição (revestimento de objetos complexos), *dip-coating* (revestimentos de objetos tridimensionais) e *spin coating* (revestimentos ultrafinos). Além da formação de uma rede de ligações siloxano, são produzidos como subprodutos das reações de condensação álcool e/ou água, dependendo da razão de precursores/álcool/água utilizadas. Estes solventes podem ser extraídos por dois métodos diferentes: por evaporação, onde se utiliza temperaturas relativamente baixas (60 - 600 °C) em pressão ambiente, formando assim um xerogel (Figura 4-e) ou por sublimação, onde a extração é promovida utilizando-se um fluido supercrítico (geralmente dióxido de carbono - CO₂) em condições de pressão e temperatura específicas, formando assim um aerogel (Figura 4-f) (OWENS et al., 2016). Após a extração dos solventes, o gel seco passa por um tratamento térmico com o propósito de ser convertido em uma cerâmica densa (filme denso) (Figura 4-g).

Na transição de sol a gel, o ponto de geleificação é constatado pelo aumento da viscosidade do sol, a ponto deste se tornar um gel expandido. Este evento ocorre à temperatura ambiente, sem acompanhamento exotérmico ou endotérmico, e sem alteração química do material. Entretanto, caso este gel permaneça em condições ambiente por longos períodos de tempo, a sua composição, estrutura e a propriedade são alteradas, devido ao processo de envelhecimento (SCHERER, 1998).

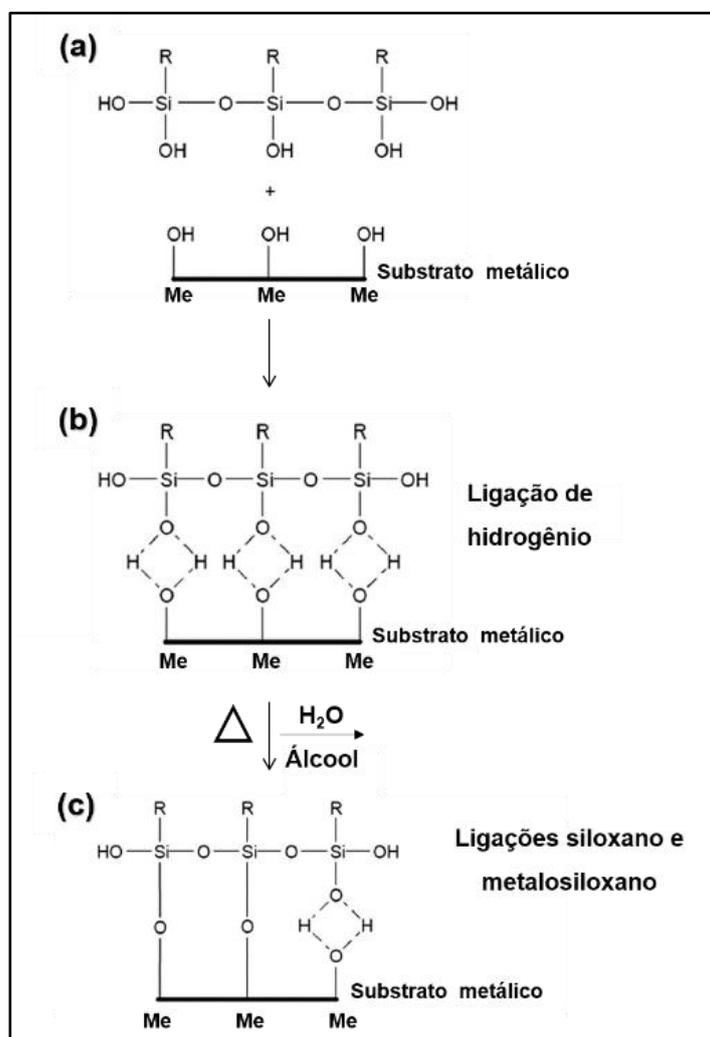
Portanto, a evaporação dos solventes ocorre através da cura, a uma temperatura apropriada, onde reações de condensação para formação de ligações metalosiloxano (Me-O-Si) e siloxano (Si-O-Si), são aceleradas, com liberação das moléculas de água, conforme Equação 3 (BRINKER et.al., 1990; WANG et al., 2009).



A Figura 5-a apresenta um esquema simplificado do mecanismo de ligação entre as moléculas dos alcóxidos de silício e a camada de hidróxidos presente na superfície do metal, durante a etapa de imersão, formando os grupos silanóis. Em seguida (Figura 5-b), os grupos silanóis (Si-OH) formados são adsorvidos espontaneamente sobre a superfície do metal (Me) por meio das ligações de hidrogênio formadas entre essas hidroxilas e as hidroxilas presentes no metal (Me-OH). Os demais silanóis, estabelecem ligações de hidrogênio entre si (BRINKER; SCHERER, 1990; KUNST, 2015). O substrato metálico é retirado da solução e submetido a um processo de cura (Figura 5-c). Por meio da cura, a uma temperatura apropriada, reações de condensação (que são aceleradas, com liberação das moléculas de água) ocorrem na interface revestimento/metal, levando a formação da ligação covalente metalosiloxano (Me-O-Si) e um revestimento reticulado, uma cadeia de siloxanos (Si-O-Si) (BRINKER; SCHERER, 1990; DANQING; OOIJ, 2003; TAKEUCHI, 2009; KUNST, 2015).

De acordo com Subramarian (1999), a reação de hidrólise pode ocorrer até que todos os grupos Si-OH tenham sido hidrolisados. Igualmente, a reação de condensação também pode ocorrer até que todos os grupos Si-OH tenham sido convertidos em um retículo de ligações Si-O-Si, porém a cinética dessas reações é dependente da composição do sistema. Entretanto, se a hidrólise não é completa, filmes de boa qualidade ainda podem ser formados, pois os grupos não hidrolisados (Si-O-C-) que restaram podem-se hidrolisar lentamente quando o metal tratado é exposto à atmosfera ou quando está em contato com alguma solução. Esses grupos não hidrolisados também podem reagir com grupos presente na camada polimérica aplicada posteriormente, porém a presença desses grupos reduz a velocidade de reticulação do filme e diminui a sua energia superficial (VAN OOIJ; CHILD, 1998).

Figura 5 - Mecanismos simplificados do processo sol-gel: (a) ligação entre as moléculas dos alcóxidos de silício e a camada de hidróxidos presente na superfície do metal; (b) ligação de hidrogênio formadas entre os grupos hidroxila dos silanóis (Si-OH) e as hidroxilas presentes no metal (Me-OH); (c) formação das ligações siloxano e metalosiloxano.



Fonte: Adaptado de KREGIEL, 2014.

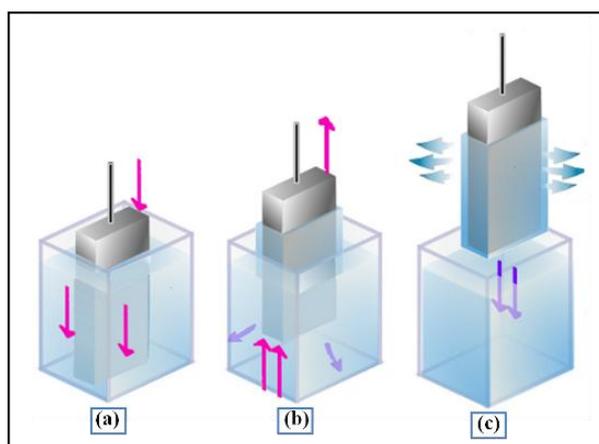
De forma geral, observando-se o mecanismo de formação de um revestimento pelo processo sol-gel, o precursor passa pela sequência de oligômero, polímero, coloide, sol, e termina finalmente como sólido (CORRIU, 2001).

Dentre algumas vantagens do processo sol-gel destacam-se: bom controle de composição, microestrutura e espessura do revestimento formado, custos reduzidos quando comparados a outros métodos, a diversidade de composições, elevada pureza dos compostos obtidos e a possibilidade de obter materiais sob diferentes configurações como fibras, corpos cerâmicos, monólitos, filmes, membranas e pós (BENVENUTTI et

al., 2009; WANG et al., 2009; CHOUDHURY; AGRAWAL, 2011; MOHSENI et al., 2014-a; OWENS et al., 2016).

Dentre as técnicas que têm sido utilizadas na deposição de revestimentos híbridos sobre superfícies o processo de *dip-coating* tem se destacado (MOHSENI et al., 2014-b; ASADI et al., 2014; KUNST et al., 2014; TIAN et al., 2015). A Figura 6 apresenta o processo *dip-coating* que consiste em: (a) imersão do substrato no sol; (b) retirada com uma velocidade controlada, do substrato anteriormente imerso no sol. Durante o movimento de emersão a suspensão é arrastada com o substrato, causando um aumento na área de evaporação e na taxa de secagem, o que leva primeiramente, à formação de uma camada de gel; (c) com o prosseguimento da secagem uma camada sólida é formada.

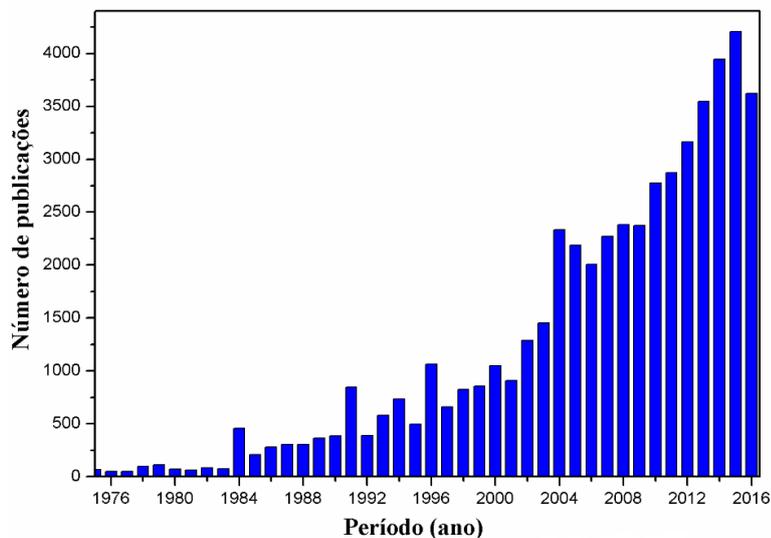
Figura 6 - Processo *dip-coating* para a deposição de filmes sol-gel: (a) amostra imersa; (b) retirada da amostra com velocidade controlada; (c) camada de revestimento uniformemente aplicada sobre a amostra.



Fonte: Adaptado de MOHSENI et al., 2014-a.

Diante dos resultados apresentados pela literatura, a motivação do trabalho também está contextualizada no crescente número de pesquisas sobre o campo de biomateriais, como pôde ser observado na Figura 7, que apresentou em um gráfico de barras o número de publicações ao longo dos anos, evidenciando o grande aumento de artigos publicados depois dos anos 2000 neste assunto.

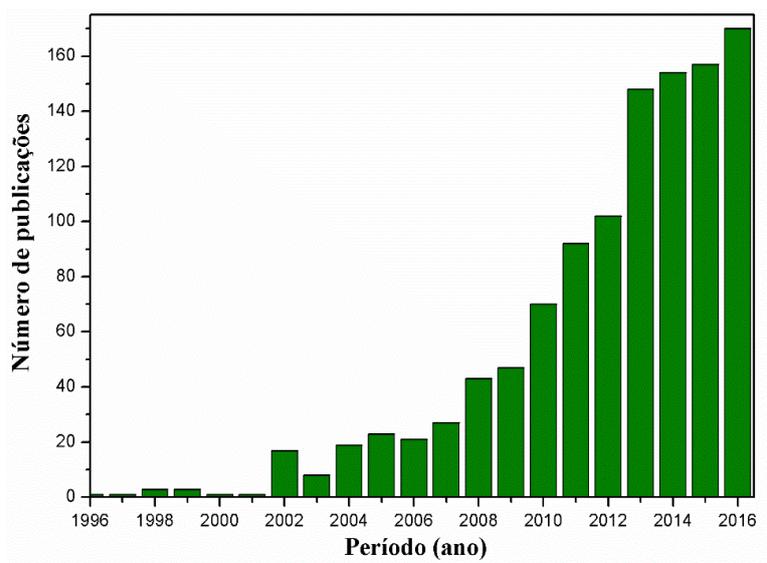
Figura 7 – Publicações científicas sobre biomateriais divulgadas a partir de 1975 até 2016.



Fonte: Adaptado de SCOPUS, 2016.

Entretanto, conforme mostrado na Figura 8, o titânio como biomaterial revestido com revestimentos híbridos ainda é pouco estudado, frente as suas inúmeras aplicações na área de biomateriais (Figura 7).

Figura 8 - Publicações científicas divulgadas a partir de 1990 até 2016, encontrado no banco de dados do Scopus, utilizando as palavras-chave "biomateriais, titânio e revestimento híbridos".



Fonte: Adaptado de SCOPUS, 2016.

Diante disso, o presente trabalho pretende contribuir com as pesquisas utilizando titânio comercialmente puro como biomaterial, visto que este é considerado um biomaterial inerte, busca-se aprimorar sua osseointegração utilizando revestimentos híbridos.

3.6 Osseointegração

A osseointegração é um requisito fundamental em ortopedia e foi originalmente definida como sendo a ligação direta, ou seja, a ausência de uma camada fibrosa em torno do osso, ocorrendo entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais. Atualmente, a osseointegração é definida como uma ligação química e físico-química entre o implante e o osso e permite a ancoragem e a manutenção a longo prazo dos implantes em condições favoráveis à reabilitação do paciente (CHUG et al., 2013).

A incapacidade de uma superfície de implante e ou/prótese se ligar ao osso adjacente e outros tecidos pode causar a formação de tecido fibroso em torno do implante, o que promove o seu afrouxamento (CHEN; THOUAS, 2015). Desta forma, é essencial para um implante ter uma superfície adequada para integrar-se bem com o osso circundante e garantir a eficácia do implante durante sua vida útil. Química, rugosidade, molhabilidade e topografia da superfície são fatores que precisam ser levados em consideração para um bom processo de Osseointegração (CHEN; THOUAS, 2015).

A utilização de revestimentos híbridos sobre superfícies metálicas pode ser uma alternativa para aprimorar a capacidade de osseointegração e diminuir a rejeição dos implantes, tornando a superfície propícia a diferenciação de células tronco mesenquimais (CTMs).

Autores têm demonstrado que a diferenciação osteogênica das CTMs são uma promissora alternativa para regeneração óssea, de tecidos e órgãos lesados (WIELAND et al., 2002; PFEIFFER et al., 2003).

3.6.1 Células-tronco mesenquimais (CTMs)

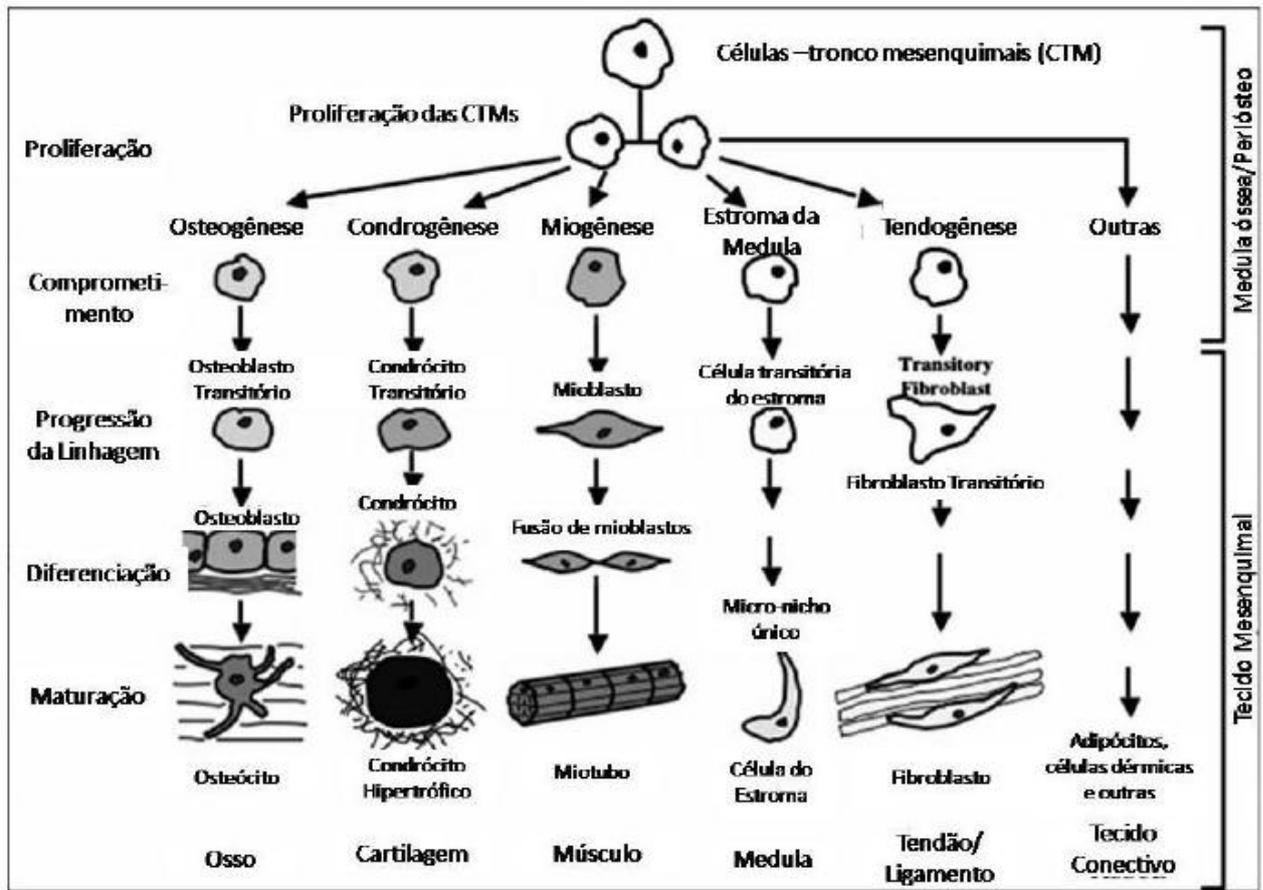
As células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas progenitores multipotentes, não hematopoiéticas, capazes de apoiar a hematopoiese (processo de renovação celular do sangue por meio de processos mitóticos, pois estas células possuem vida muito curta), e de se dividir, com a função de se auto-renovarem. Estas células podem ser facilmente isoladas a partir de tecidos adultos, sendo capazes de serem expandidas em cultura e quando estimuladas apropriadamente podem se diferenciar em três (osteogênica, adipogênica e condrogênica) ou mais linhagens celulares (miogênica, cardiomiogênica, etc.), originando tecidos ósseos, cartilagosos ou adiposos (PRESNELL et al., 2002; GROVE et al., 2004).

As CTMs podem ser encontradas em vários outros órgãos, contudo em quantidades variadas. Dentre eles, tem-se: sistema nervoso central e periférico, pele (GUREVITCH et al., 2003), sangue periférico, tecido adiposo, fígado, líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e placenta (BOBIS et al., 2006). Mas, a medula óssea é considerada um dos principais sítios de CTMs devido à maior quantidade e facilidade de obtenção dessas células (PAYUSHINA et al., 2006).

O tecido ósseo está em constante renovação durante a vida de um indivíduo e, este processo requer o recrutamento e a proliferação de células-tronco com capacidade para se diferenciar em osteoblastos os quais, irão sintetizar e mineralizar a matriz óssea. É de conhecimento que as CTMs fornecem células osteoprogenitoras e há na literatura comprovação de que transplantes de células da medula na epífise de ossos longos de camundongos irradiados promoveram repopulação de células com capacidade para se diferenciarem em osteoblastos funcionais o que reafirma a importância destas células na diferenciação osteoblástica (OLMSTED-DAVIS et al., 2003; OCARINO, 2008).

As superfícies dos implantes devem ter a capacidade de atrair e estimular a diferenciação quando em ambiente de CTMs, aumentando o contato osso-implante, propiciando uma reconstituição óssea mais adequada. Na Figura 9 estão apresentados exemplos de diferenciações de CTMs em fenótipos conhecidos.

Figura 9 -Transições da célula-tronco mesenquimal (CTM) em diversos fenótipos.



Fonte: Adaptado de CAPLAN, 2007.

Células-tronco mesenquimais da medula óssea possuem grande capacidade para expansão em cultura. Entretanto, a sua retirada da medula do paciente requer um processo cirúrgico com uma recuperação dolorosa, além do baixo número de células colhidas durante esse procedimento (ZAVAN et al., 2011). Dessa forma, foram investigadas alternativas para coletar CTMs em abundância de forma mais acessível e menos invasiva (ZAVAN et al., 2011, KIM et al., 2012), sendo encontradas CTMs no tecido adiposo, no cordão umbilical (YOUNG et al., 2001; ZUK et al., 2002; ROMANOV et al., 2003) e também na polpa de dente (NISHINO et al., 2011).

Determinadas topografias na superfície podem interferir na formação e dissociação da adesão e espraiamento de células-tronco mesenquimais por meio do contato dessa superfície com a membrana celular e compartimentos da própria matriz celular. Além disso, fatores como a química, molhabilidade, rugosidade e topografia das superfícies dos implantes influenciam diretamente na adesão, viabilidade e

diferenciação celular (LIU et al., 2004; CHEN; KO, 2013; AGARWAL; GARCÍA, 2015; SHIBATA et al., 2015; SHARMA et al., 2016).

Autores salientam que a composição química da camada de adsorção da superfície pode impactar sobre o progresso da linhagem das CTMs (LE GUILLOU-BUFFELLO et al., 2008). Superfícies nano e microestruturadas e a forma como CTMs atacam o substrato irão influenciar na adsorção de proteínas (YANG et al., 2002).

Em ambiente de células-tronco mesenquimais, a diferenciação pode ser provocada como também inibida pelo uso de uma determinada topografia. No estudo de McMurray (2011), o autor mostrou que superfícies com nano-pits podem manter as células em um estado não diferenciado, conservando-as auto renováveis. A partir disso as células-tronco mesenquimais precisam ter uma capacidade de recombinar, diferenciar e ter preferências por determinados padrões.

Navarrete-Olivares et al. (2010) mostraram que a diferenciação em osteoblastos aumentou, e que os parâmetros da superfície exerceram efeito positivo sobre células-tronco mesenquimais multipotentes. As CTMs exibiram características de osteoblastos (Fosfatase Alcalina, RUNX2 e Osteocalcina) quando em crescimento sobre titânio e este efeito foi maior em superfícies hidrofílicas. Esse estudo ainda enfatizou que as CTMs foram sensíveis as propriedades do substrato que induziram a diferenciação osteoblástica.

Osteoblastos aderem mais a superfície micrométrica rugosa do que superfícies lisas e exibem uma maior diferenciação (LAI et al., 2009; NAVARRETE-OLIVARES et al., 2010). CTMs ou células progenitoras totalmente diferenciadas em uma linhagem osteoblástica produzem fatores em resposta a topográfica da superfície em escala micrométrica e submicrométrica. Estes fatores influenciam sobre o crescimento ao redor do tecido, o qual irá induzir a formação do osso. Esse processo é importante para o sucesso da Osseointegração (NAVARRETE-OLIVARES et al., 2010).

As células-tronco mesenquimais são extremamente sensíveis ao ambiente que são expostas. Isso indica que o conhecimento sobre a topografia, molhabilidade, rugosidade e química da superfície onde essas células serão cultivadas, são de suma importância para o processo de diferenciação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em duas Etapas. Na Etapa 1, três diferentes pré-tratamentos foram testados sobre o titânio comercialmente puro buscando o melhor dentre eles para aumentar a adesão desse substrato com o revestimento híbrido constituído pelos precursores alcóxidos de silício TEOS/MTES obtido via processo sol-gel. Na Etapa 2, definido o melhor desempenho dentre os pré-tratamentos da Etapa 1, aplicou-se este pré-tratamento sobre o titânio comercialmente puro e em seguida o revestimento híbrido constituído pelos precursores alcóxidos de silício TEOS/MTES com a adição de partículas de hidroxiapatita para avaliar a adesão, viabilidade e diferenciação celular.

4.1 Materiais – Etapa 1 e 2

Neste item estão descritos todos os materiais utilizados nas Etapas 1 e 2 da pesquisa.

Foi utilizado como substrato para a deposição do revestimento híbrido o titânio comercialmente puro de grau 2 (Ti-Cp 2), segundo norma ASTM F67. O Ti-Cp foi adquirido na empresa TiBrasil Titânio Ltda, na forma de barra cilíndrica com diâmetro de 14 mm, sendo as amostras cortadas, transversalmente ao eixo da barra, na espessura de 1,5 mm, cada. A análise da composição química elementar do Ti-Cp foi realizada por análise de fluorescência de raios X e informada no boletim técnico do fornecedor (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química elementar da barra de Ti-Cp grau 2 utilizada na pesquisa.

Elemento Químico	Nitrogênio (max.)	Carbono (max.)	Hidrogênio (max.)	Ferro (max.)	Oxigênio (max.)	Titânio
%	0,03	0,10	0,015	0,30	0,25	Bal.

Fonte: Boletim técnico do fornecedor.

A Tabela 2 apresenta as informações técnicas dos demais reagentes utilizados neste trabalho.

Tabela 2 - Informações técnicas dos reagentes utilizados.

Reagente	Sigla	Peso Molecular (g.mol⁻¹)	Pureza (%)	Fornecedor
Tetraetoxisilano	TEOS	208,33	99,0	Sigma-Aldrich
Metiltrietoxisilano	MTES	178,30	99,0	Sigma-Aldrich
Ácido Fluorídrico	HF	20,01	40,0	F. Maia
Ácido Nítrico	HNO ₃	63,012	66,2	Neon
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	98,08	95,0	Dinâmica
Peróxido de Hidrogênio	H ₂ O ₂	34,01	35,0	Neon
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07	99,5	Anidrol
Hidróxido de Sódio	NaOH	40,00	98,3	Neon
Hidroxiapatita	HA	502,31	90,0	Sigma-Aldrich

Fonte: boletim técnico dos fornecedores.

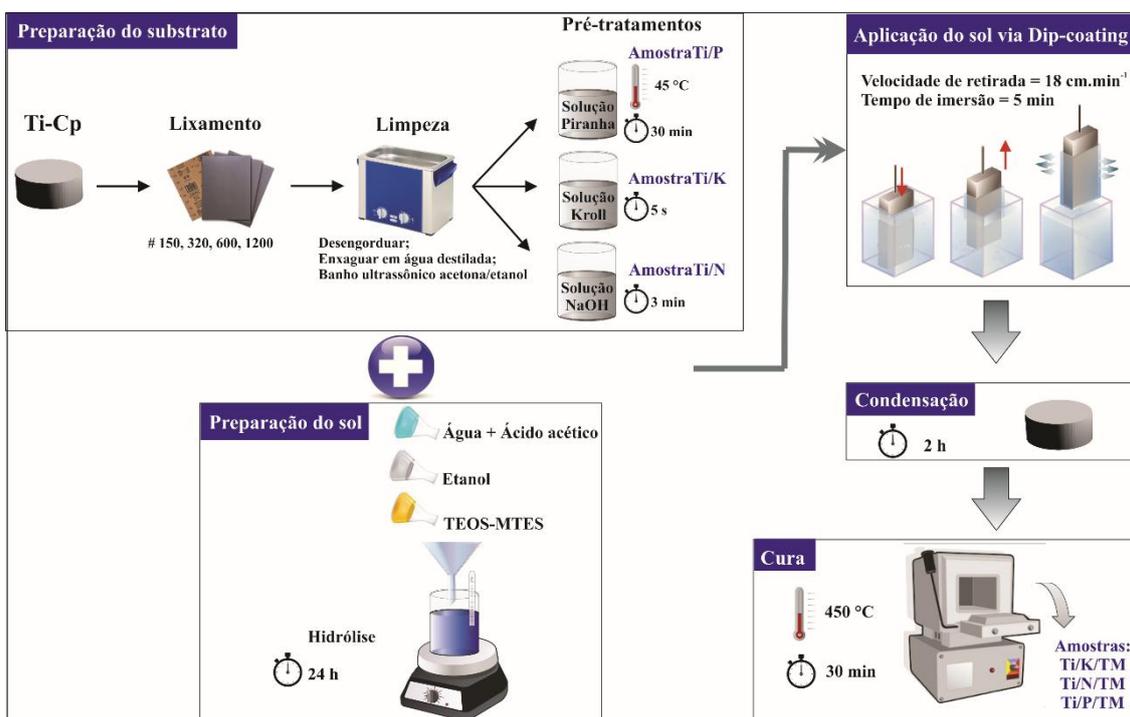
4.2 Métodos

Neste item estão descritos os métodos utilizados nas Etapas 1 e 2 deste trabalho.

4.2.1 *Pré-tratamentos no Ti-Cp da Etapa 1*

Neste item estão descritos os métodos utilizados para aplicação de três diferentes pré-tratamentos sobre a superfície do Ti-Cp. A aplicação destes tem como finalidade avaliar e selecionar qual é o mais adequado para aumentar a aderência do revestimento híbrido constituído pelos precursores alcóxidos de silício TEOS/MTES obtido via processo sol-gel no substrato Ti-Cp. A metodologia dessa Etapa 1 está representada, na forma de fluxograma de trabalho, na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma da metodologia utilizada na Etapa 1, com os parâmetros experimentais da síntese do sol, pré-tratamentos superficiais e procedimentos para deposição do revestimento híbrido no Ti-Cp.



Fonte: o autor.

4.2.1.1 Preparação da superfície do substrato da Etapa 1

As amostras de Ti-Cp foram lixadas manualmente com lixas de carbo de sílica de grana até 1200, realizado com movimentos verticais e completos sob fluxo de água, para retirada de óxidos e sujidades da superfície, resultando em um nivelamento dessas.

Na sequência, as amostras foram desengorduradas em detergente alcalino, lavadas em água destilada e imersas em banho ultrassônico (Unique, MaxiClean 800, Brasil) em acetona e etanol pelo tempo de 10 min cada (AMATO et al., 2005; GARCÍA et al., 2006; BALLARRE et al., 2011; BALLARRE et al., 2013; WANG et al., 2013).

4.2.1.2 Pré-tratamentos superficial da Etapa 1

Posteriormente a preparação do substrato, três diferentes pré-tratamentos foram realizados nas superfícies do Ti-Cp.

No pré-tratamento com solução Kroll as amostras foram imersas por 5 s em solução constituída por 3 mL de ácido fluorídrico (HF), 6 mL de ácido nítrico (HNO₃) e 100 mL de água destilada. Na sequência as amostras foram lavadas em água destilada, imersas em etanol e secas ao ar (DIMAH et al., 2012).

No pré-tratamento NaOH utilizado, ocorreu com a imersão das amostras em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01M (pH = 11,5), durante 3 min a temperatura ambiente, a fim de promover a ativação da superfície pela presença das hidroxilas. Por fim, as amostras foram lavadas com água destilada e secas ao ar (CAPIOTTO, 2006).

No pré-tratamento Piranha as amostras foram submersas em solução piranha constituída por 10 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e 10 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 30 min à 45°C, após lavadas em banho de ultrassônico com água deionizada (30 min) e etanol (10 min) e secas ao ar (DUBRUEL et al., 2006; RODRÍGUEZ-CANO et al., 2013).

4.2.1.3 Preparação do revestimento via processo sol-gel da Etapa 1

Os revestimentos híbridos utilizados neste trabalho foram obtidos a partir das reações de hidrólise dos precursores alcóxidos de silício tetraetoxissilano (TEOS) e metiltrietoxissilano (MTES) em etanol (C₂H₆O) e água destilada. A razão molar dos precursores alcóxidos foi mantida constante (TEOS/MTES = 40:60), e ácido nítrico (0,1 mol.L⁻¹) foi utilizado como o catalisador (AMATO et al., 2005; GARCÍA et al., 2006; BALLARRE et al., 2011; BALLARRE et al., 2013; WANG et al., 2013).

Uma primeira solução foi preparada pela mistura de etanol absoluto com os precursores alcóxidos de silício, a temperatura ambiente sob agitação em um agitador magnético (Fisatom, 752), após a homogeneização, foi adicionado aos poucos água previamente acidificada com ácido. Após 10 min, a solução foi mantida a 40°C e a agitação continuou constante durante 3 h, até um sol transparente e límpido ser obtido com um pH entre 1,0 e 2,0. Posteriormente, objetivando a maior formação de grupos silanóis, o processo de hidrólise do sol foi conduzido à temperatura ambiente sem agitação por um período de 24 h (AMATO et al., 2005; GARCÍA et al., 2006; BALLARRE et al., 2011; BALLARRE et al., 2013; WANG et al., 2013; KUNST et al., 2014).

A aplicação do sol sobre o substrato de Ti-Cp para a formação do revestimento foi realizada via processo *dip-coating* à temperatura ambiente (19-23°C), com aplicação de uma camada, velocidades de imersão e emersão de 18 cm.min⁻¹ e tempo de permanência do substrato no sol de 5 min. Após a aplicação do sol as amostras permaneceram expostas ao ar por 2 h, em temperatura ambiente (19-23°C) para promover a evaporação dos solventes e o início do processo de condensação do revestimento sobre o substrato e, posteriormente com o objetivo de uma melhor e mais rápida reticulação do revestimento, as amostras foram levadas ao forno mufla (SANCHIS, Brasil) à temperatura de 450°C durante 30 min para o processo de cura. Este processo foi realizado com rampa de aquecimento com taxa de 10°C.min⁻¹. Este procedimento visa ambientar a amostra à elevação da temperatura gradativamente, evitando que os solventes presentes no revestimento evaporem de forma instantânea, causando fissuras no mesmo (AMATO et al., 2005; GARCÍA et al., 2006; BALLARRE et al., 2011; BALLARRE et al., 2013; WANG et al., 2013).

4.2.1.4 Caracterização do sol da Etapa 1

A viscosidade do sol produzido foi avaliada após 24 h de hidrólise. A viscosidade foi analisada em um viscosímetro Brookfield DV2T, com rotação variável e uma temperatura constante (23 °C).

As propriedades térmicas dos precursores alcóxidos de silício, do sol hidrolisado 24 h e após a cura em 450°C foram analisados pelos ensaios termogravimétricos em um equipamento TGA Shimadzu TGA-50 (Japão), com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ em atmosfera inerte de N₂ (50 mL.min⁻¹) com temperaturas de 10 até 800°C.

Os precursores alcóxidos de silício e o sol hidrolisado 24 horas e após a cura em 450°C foram analisados por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) em um espectrômetro Nicolet IS10 Thermo Scientific (USA) na região compreendida entre 4000 e 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. As amostras foram preparadas pelo método de pastilha de brometo de potássio (KBr).

Para as análises de TGA e FTIR do sol após a cura, o mesmo foi colocado em um cadinho e curado em forno mufla, na temperatura de 450 °C.

O desempenho das amostras frente a corrosão foi avaliado por meio do ensaio eletroquímico de polarização potenciodinâmica e pelo potencial de circuito aberto

(OCP). O ensaio eletroquímico de polarização potenciodinâmica foi realizado com um equipamento potenciostato/galvanostato, modelo Ivium Stat, empregando-se uma célula convencional de três eletrodos, sendo o eletrodo de referência o de calomelano saturado (ECS) e contra-eletrodo de platina. A medida foi realizada em meio não agitado, naturalmente aerado e à temperatura ambiente, o eletrólito utilizado foi o SBF (fluido corporal simulado). O potencial de circuito aberto (OCP) foi monitorado durante a primeira hora de imersão no eletrólito antes do ensaio de polarização. A área do eletrodo de trabalho foi de $0,78 \text{ cm}^2$ e as curvas de polarização foram coletadas a uma velocidade de varredura de 1 mV.s^{-1} .

4.2.1.5 Caracterização das amostras pré-tratadas e dos revestimentos da Etapa 1

A morfologia dos revestimentos foi avaliada por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG), equipamento Tescan Mira3 (República Checa). Para viabilizar a análise de MEV-FEG foi aplicado um filme fino de ouro por *magnetron-sputtering* a plasma, pois as amostras são isolantes, então torna-se necessário aplicar um filme de material condutor sobre a superfície da amostra, neste caso o ouro. As amostras foram observadas em vista de topo para identificação da morfologia superficial inicial e em corte transversal a fim de visualizar e estimar a espessura dos filmes formados. O mapeamento elementar dos revestimentos foi realizado por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), utilizando-se um equipamento marca Oxford Instruments, modelo X-Max^d.

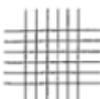
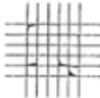
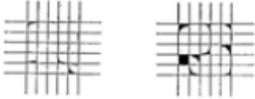
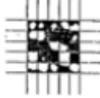
O teste de adesão *Crosshatch and Tape Pull Test* foi realizado em conformidade com a norma ASTM D-3359/09 (2010), onde são realizados riscos verticais e riscos horizontais, formando quadrados de $1 \times 1 \text{ mm}$. Em seguida uma fita adesiva especial (3M) foi aplicada e pressionada sobre a superfície do revestimento riscado. Após 3 minutos a fita foi removida em direção paralela ao substrato. Na retirada rápida da fita, por uma das extremidades, foi avaliada a adesão da camada do revestimento híbrido em função da quantidade de deslocamento do filme, que foi observado com o auxílio de microscopia MEV-FEG e EDS. Como critério de avaliação da aderência será utilizado os dados fornecidos pela ASTM D3359-09 (Tabela 3).

O ângulo de contato foi medido pelo método da gota séssil a partir de um aparato desenvolvido pelo Laboratório Pesquisa em Corrosão (LAPEC) da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em que uma gota de um líquido, neste trabalho este líquido foi o sol formado pelo TEOS/MTES, foi depositada sobre a superfície de um sólido por meio de uma micro seringa. A gota de sol foi observada por meio de uma lente de baixo aumento, e o ângulo de contato medido através de um goniômetro. Este tipo de medida é chamado de estático. O valor do ângulo de contato de uma gota de líquido depende da energia de superfície da amostra e a tensão superficial do líquido. O ângulo de contato foi determinado por meio de um programa de análise de imagens SurfTens 3.0.

A microrugosidade das superfícies das amostras foi avaliada em um perfilômetro de contato (TalySurf, Brasil), analisando-se o valor de rugosidade Ra (rugosidade média aritmética – valores absolutos) e Rz (corresponde à distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais profundo – distribuição média de toda superfície).

Tabela 3 - Critérios para avaliação de aderência para o revestimento.

Classificação	Percentual de área removida (%)	Aspecto da amostra após o teste
5B	0	
4B	Menos que 5	
3B	5 - 15	
2B	15 - 35	
1B	35 - 65	
0B	Mais que 65	

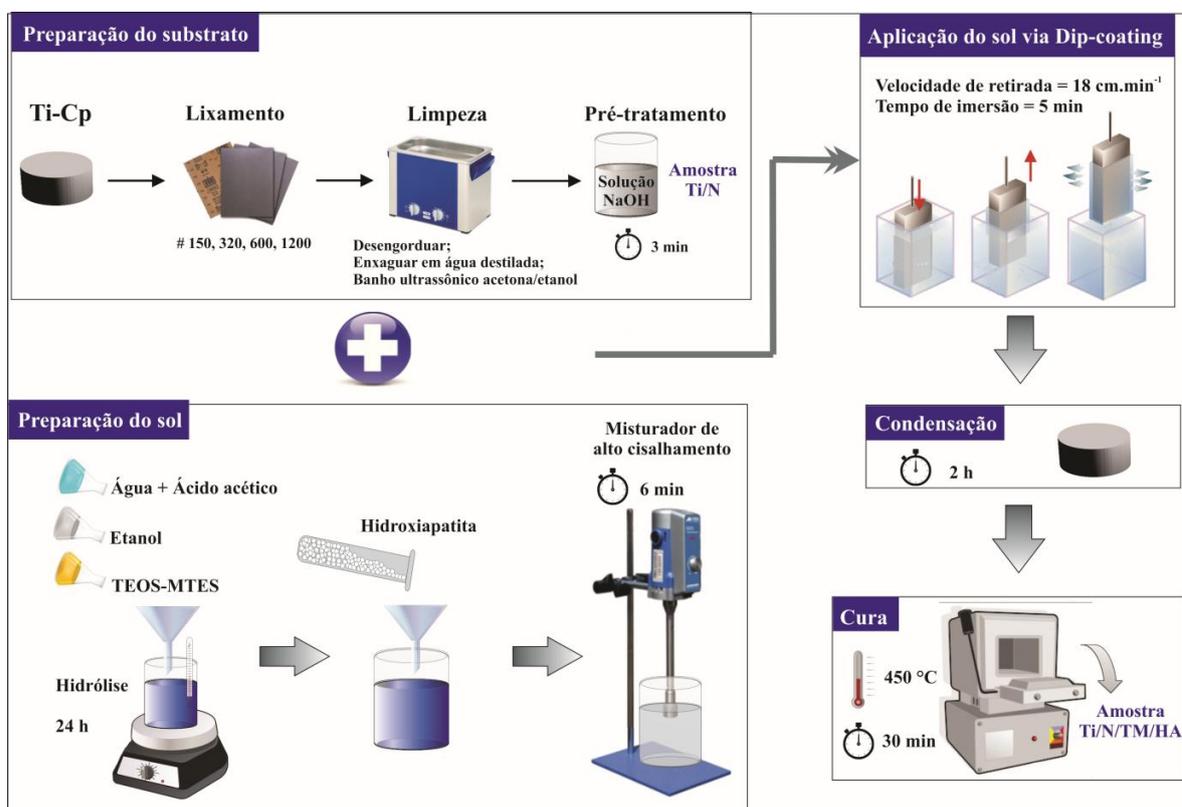
Fonte: Adaptado de ASTM D-3359-09, 201.

4.2.2 Aplicação do revestimento híbrido TEOS/MTES com hidroxiapatita da Etapa 2

A Etapa 2 deste estudo consistiu-se na seleção e aplicação do melhor pré-tratamento superficial da Etapa 1 sobre o Ti-Cp, seguindo para a deposição do revestimento híbrido constituído pelos precursores alcóxidos de silício TEOS/MTES com a adição de partículas de hidroxiapatita, via processo sol-gel. Este revestimento foi considerado e denominado neste estudo como revestimento híbrido bioativo.

A metodologia da Etapa 2 está representada no fluxograma da Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma da metodologia utilizada na Etapa 2, com os parâmetros experimentais da síntese do sol, melhor pré-tratamento escolhido na Etapa 1 e os procedimentos para deposição do revestimento híbrido bioativo no Ti-Cp.



Fonte: o autor.

A Tabela 4 apresenta a identificação das amostras das Etapas 1 e 2, e essas são descritas de acordo com o pré-tratamento realizado na superfície do substrato e o revestimento híbrido aplicado em suas superfícies.

Tabela 4 - Codificação e descrição das amostras estudadas nas Etapas 1 e 2 da pesquisa.

Amostra	Descrição
Ti	Substrato de titânio comercialmente puro lixado
Ti/K	Substrato de titânio comercialmente puro lixado e pré-tratado com solução Kroll
Ti/P	Substrato de titânio comercialmente puro lixado e pré-tratado com solução Piranha
Ti/N	Substrato de titânio comercialmente puro lixado e pré-tratado com solução NaOH
Ti/K/TM	Substrato de titânio comercialmente puro lixado e pré-tratado com solução Kroll com revestimento híbrido TEOS e MTES
Ti/P/TM	Substrato de titânio comercialmente puro lixado e pré-tratado com solução Piranha com revestimento híbrido TEOS e MTES
Ti/N/TM	Substrato de titânio comercialmente puro lixado e pré-tratado com solução NaOH com revestimento híbrido TEOS e MTES
Ti/N/TM/HA	Substrato de titânio comercialmente puro lixado e pré-tratado com solução NaOH com revestimento híbrido TEOS e MTES e adição de hidroxiapatita

4.2.2.1 Preparação da superfície do substrato da Etapa 2

As amostras de Ti-Cp foram lixadas manualmente e limpas como descrito na metodologia do item 4.2.1.1. Após o Ti-Cp foi pré-tratado com o melhor desempenho de pré-tratamento superficial, da Etapa 1.

4.2.2.2 Preparação do revestimento via processo sol-gel da Etapa 2

Os revestimentos híbridos bioativos utilizados neste trabalho foram obtidos a partir das reações de hidrólise dos precursores alcóxidos de silício tetraetoxisilano (TEOS) e metiltrietoxisilano (MTES) em etanol (C_2H_6O) e água destilada. A razão molar dos precursores alcóxidos foi mantida constante (TEOS/MTES = 40:60), e ácido nítrico ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) foi utilizado como o catalisador (AMATO et al., 2005; GARCÍA et al., 2006; BALLARRE et al., 2011; BALLARRE et al., 2013; WANG et al., 2013).

A solução foi preparada por meio da mistura de etanol absoluto com os precursores alcóxidos de silício, a temperatura ambiente sob agitação em um agitador magnético (Fisatom, 752), após a homogeneização, foi adicionado aos poucos água previamente acidificada com ácido. Após 10 min, a solução foi mantida a 40°C e a agitação continuou constante durante 3h, até um sol transparente e límpido ser obtido com um pH entre 1,0 e 2,0. Posteriormente, objetivando a maior formação de grupos

silanóis, o processo de hidrólise do sol foi conduzido à temperatura ambiente sem agitação por um período de 24 h (AMATO et al., 2005; GARCÍA et al., 2006; BALLARRE et al., 2011; BALLARRE et al., 2013; WANG et al., 2013; KUNST et al., 2015).

O processo de hidrólise foi conduzido por 24 h e após esse tempo foram adicionados 5% em massa de hidroxiapatita na solução sol contendo os precursores TEOS/MTES. Posteriormente o sol foi agitado manualmente até a uniformização da hidroxiapatita no sol, e este foi conduzido para homogeneização um misturador de alto cisalhamento (mixer homogeneizador) durante 6 min (GARCÍA et al., 2004; BALLARRE et al., 2010; BALLARRE et al., 2013; OMAR et al., 2015).

A aplicação do sol sobre o substrato de Ti-Cp para a formação do revestimento híbrido bioativo foi realizada via processo *dip-coating* à temperatura ambiente (19-23°C), com aplicação de uma camada, velocidades de imersão e retirada de 18 cm.min⁻¹ e tempo de permanência do substrato no sol de 5 min. Após a aplicação do sol as amostras permaneceram expostas ao ar por 2 h em temperatura ambiente para promover a evaporação dos solventes e o início do processo de condensação do revestimento sobre o substrato e, posteriormente com o objetivo de uma melhor e mais rápida reticulação do revestimento, as amostras foram levadas ao forno mufla à temperatura de 450 °C durante 30 min para o processo de cura. Este processo foi realizado com rampa de aquecimento com taxa de 10 °C.min⁻¹ (AMATO et al., 2005; GARCÍA et al., 2006; BALLARRE et al., 2011; BALLARRE et al., 2013; WANG et al., 2013).

4.2.2.3 Caracterização das partículas da hidroxiapatita (HA) da Etapa 2

A distribuição de tamanho dos aglomerados e das partículas do pó da HA foi determinada com um granulômetro por difração de laser, fabricado pela Cilas (modelo 1180). A faixa de detecção deste equipamento situa-se entre 0,04 a 2500 µm. A amostra analisada por esta técnica foi dispersa em água e submetida a agitação por ultrassom durante 60 s para desagregação.

A morfologia das partículas de HA foi observada por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG), equipamento Tescan, modelo Mira3.

O mapeamento elementar dos revestimentos foi realizado por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), utilizando-se um equipamento marca Oxford Instruments, modelo X-Max^d.

Com o objetivo de identificar as fases cristalinas presente no pó da HA, realizou-se a análise de difração de raios X (DRX), que foi realizada em um difratômetro SHIMADZU-XRD 6000 (Japão) com ângulo de difração (2θ), no intervalo de 20 a 80° e tempo de varredura de 0,02°/2s (APARICIO et al., 2011). O equipamento foi operado utilizando uma tensão de 40 kV, corrente de 40 mA e utilizando a radiação $K\alpha Cu = 1,54178 \text{ \AA}$.

As partículas de HA foram analisadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) descrito na seção 4.2.1.4.

4.2.2.4 Caracterização do sol com partículas de hidroxiapatita da Etapa 2

A viscosidade do sol produzido foi avaliada após 24 h da adição da HA. A viscosidade foi analisada em um viscosímetro Brookfield DV2T, com rotação variável e uma temperatura constante (23 °C).

O sol contendo as partículas de HA foi analisado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) descrito na seção 4.2.1.4.

4.2.2.5 Caracterização das amostras com revestimento híbrido bioativo - Etapa 2

A morfologia do revestimento bioativo foi avaliada por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) e o mapeamento elementar do revestimento foi realizado por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) como descritos na seção 4.2.1.5.

O teste de adesão *Crosshatch and Tape Pull Test* e as microrugosidades por perfilometria nas superfícies dos revestimentos híbridos foram realizados como descritos na seção 4.2.1.5.

O ângulo de contato foi realizado como descritos na seção 4.2.1.5, porém o líquido utilizado neste caso foi água.

A análise de microscopia de força atômica (AFM) foi realizada como descrito na seção 4.2.1.5.

4.3 Caracterização Biológica da Etapa 2

4.3.1 Obtenção e cultivo das células-tronco mesenquimais (CTMs)

Para o presente trabalho, as células-tronco mesenquimais (CTMs) foram isoladas da polpa de tecido de dentes decíduos, como descrito por (STEFFENS et al., 2015). Os dentes foram extraídos de crianças saudáveis, matriculados no programa de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRGS, após consentimento por escrito dos pais/responsáveis. Os dentes foram transportados para o Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS para isolamento das CTMs. Para isso, após o isolamento, as células aderentes foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*, D5523, Sigma Aldrich., St Louis, MO, EUA) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. O meio de cultura foi alterado a cada 3-4 dias. As passagens foram realizadas conforme necessário e as células foram testadas para diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, bem como perfil de imunofenotipagem (dados não apresentados), anteriormente aos experimentos.

O uso de células humanas nos biomateriais foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Nº CAAE 36403514.6.0000.5347).

4.3.2 Estudo de biocompatibilidade *in vitro*

A biocompatibilidade das superfícies de titânio, bem como a do titânio com o revestimento híbrido e com o revestimento híbrido contendo hidroxiapatita foi avaliada por adesão, viabilidade celular, morfologia e capacidade de diferenciação osteogênica.

Para as análises de adesão, viabilidade celular, citotoxicidade e morfologia foram utilizadas três culturas primárias diferentes. Já para os testes de diferenciação osteogênica foram utilizadas duas culturas primárias diferentes. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Todas as amostras foram esterilizadas em lâmpada UV por 120 min.

4.3.2.1 Adesão celular

Para avaliar a adesão celular, 30.000 células foram semeadas em todos os tipos de biomateriais e comparadas com um grupo controle, que consistiu em células cultivadas diretamente em uma superfície plástica de placas de cultura. No experimento, as células foram coradas com 4, 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), um marcador do núcleo celular, após 6 horas de semeadura nos *scaffolds*. Após isso, foram realizadas fotografias em 9 pontos aleatoriamente escolhidos em cada matriz com aumento de 400x nos *scaffolds* e a média de células por tipo de matriz foi calculada. O resultado foi expresso como um número médio de células por grupo.

4.3.2.2 Análise de viabilidade celular

A viabilidade foi realizada utilizando o reagente WST-8 ([2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazólio]) (Sigma-Aldrich®). Para isso, 30.000 células foram semeadas em cada *scaffold*. Após 1, 4 e 7 dias de cultivo, o reagente WST-8 foi adicionado a todos os grupos de biomateriais e deixado em contato com as células por 1 hora, de acordo com as instruções do fabricante. Seguindo isso, a solução foi levada para leitura da absorbância da solução, em um espectrômetro (Spectramax, Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 450 nm. Um grupo de controle, que consistiu em células diretamente cultivadas no poço, também foi avaliado pelo teste WST-8.

4.3.2.3 Morfologia celular

Para verificar a presença e a morfologia das células nos *scaffolds*, as amostras foram avaliadas por microscopia confocal. Para isso, três amostras de cada biomaterial foram fixadas com paraformaldeído durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, deixou-se em contato com os biomateriais uma solução de Triton em PBS (PBS/Triton) (0,1%) durante 30 minutos. Em seguida, adicionou-se a solução de faloidina/rodamina (200 µg/mL) em solução de PBS/Triton aos poços contendo os biomateriais durante 40 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após este período, a solução foi removida e o corante DAPI foi adicionado para marcação dos

núcleos celulares durante um período de 1 minuto a temperatura ambiente, protegido da luz. Foram realizadas sucessivas lavagens e os biomateriais contendo as células marcadas foram mantidos refrigerados e longe da luz até o momento da análise.

4.3.2.4 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada pela medição da enzima lactato desidrogenase (LDH) utilizando um método colorimétrico (Labtest). No ensaio de LDH, o vazamento da enzima LDH localizada no citoplasma no meio extracelular foi medido e sua presença no meio de cultura celular foi indicativa do dano da membrana celular. Para os testes, as alíquotas do sobrenadante das culturas foram medidas após 1, 4 e 7 dias de cultivo. As células cultivadas diretamente na superfície plástica das placas de cultura foram utilizadas como controle de não toxicidade. A leitura da absorvância foi realizada em *Wallac EnVision* (Perkin Elmer).

4.3.2.5 Capacidade de diferenciação osteogênica

Após a obtenção e caracterização das CTMs, estas foram dispersas sobre os diferentes sistemas para avaliação da diferenciação osteogênica das mesmas.

A diferenciação osteogênica foi realizada pelo cultivo durante 21 dias em meio contendo soro fetal bovino (10%), dexametasona (10^{-6} M), ácido ascórbico 2-fosfato (5 µg/mL) e β-glicerofosfato (10mM), seguindo o protocolo descrito em Meirelles e Nardi (2006).

Para tal experimento foram testados 5 diferentes grupos: 1) controle negativo, consistindo de células cultivadas em poços de cultivos, sem estímulo do meio de diferenciação; 2) controle positivo, consistindo de CTM cultivadas diretamente em poços de cultivos e submetidas ao protocolo de diferenciação; 3) Ti-Cp, onde as células foram cultivadas sobre o biomaterial de titânio e submetidas à diferenciação; 4) Ti/N/TM, no qual CTM foram semeadas e receberam o meio de diferenciação; e 5) Ti/N/TM/HA no qual CTM foram semeadas e receberam o meio de diferenciação

A capacidade de diferenciação foi verificada após 20 dias de experimento. Para a análise, as replicatas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos. Em seguida, todos os grupos passaram por coloração com Alizarin Red por 20 minutos.

Depois de realizada a lavagem com água Milli-Q, 500 microlitros de ácido acético 10% foi adicionado aos poços contendo as células e/ou biomateriais até dissolução completa de todos os cristais de cálcio corados. Desses, 50 microlitros foram transferidos para uma placa de 96 poços e 100 microlitros de uma solução de hidróxido de amônio foi adicionado. A leitura em leitor de placas foi realizada imediatamente, em 405 nm.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das replicatas realizadas.

4.3.3 Análise estatística

Inicialmente, todos os dados obtidos foram analisados quanto à sua normalidade a fim de verificar a necessidade de testes paramétricos ou não-paramétricos para as comparações.

Para as análises de adesão celular foi realizado o teste *one-way* ANOVA, seguido pelo *post hoc* Tukey. Já para os testes de viabilidade celular e de citotoxicidade foi realizado o teste de medidas repetidas seguido por *post hoc* Tukey.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 16.0 – SPSS, Chicago, IL, USA) e o nível de significância adotado no estudo foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta parte da pesquisa são apresentados os resultados e discussão das diferentes Etapas do estudo. A Etapa 1 é constituída pelos resultados de caracterização do sol, e a influência de diferentes pré-tratamentos na adesão do revestimento híbrido TEOS/MTES ao Ti-Cp. A Etapa 2 é constituída pelos resultados de caracterização do pó da HA, do sol TEOS/MTES com a adição de partículas de HA, bem como as caracterizações do revestimento híbrido TEOS/MTES com HA depositado em Ti-Cp, seguindo para os resultados de adesão, viabilidade e diferenciação celular sobre esse revestimento.

5.1 Caracterização do sol - Etapa 1

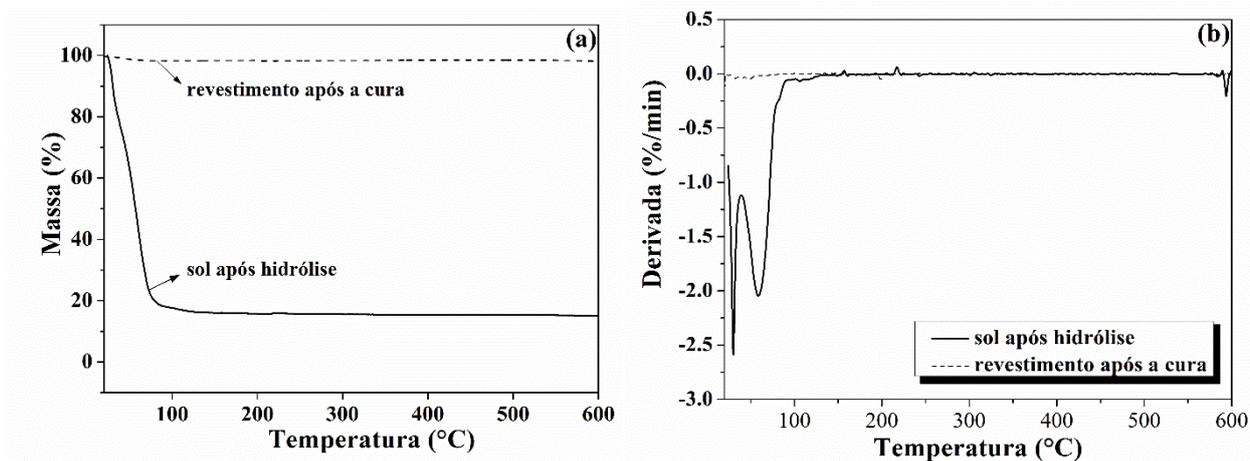
O valor da viscosidade do sol após 24 h de hidrólise foi de 2,57 cP, valor similar ao encontrado para esse mesmo sistema híbrido, em estudos de García et al. (2006) e Ballarre et al. (2009), ambos valores de 2,6 cP. A coerência no resultado se deve a baixa viscosidade dos precursores alcóxidos puros (> 1.0 cP) e o alto teor de água e álcool presentes no sol.

O sol apresentou caráter ácido, com pH final entre 1 a 2 (BALLARRE et al., 2011), visto que para sols à base de precursores alcóxidos de silício, baixas viscosidades estão relacionadas à pHs ácidos, desta maneira, em uma mesma concentração de precursores alcóxidos de silício, a viscosidade aumenta em pH básico e diminui em pH ácido (IIJIMA et al., 2007). Além disso, sob condições ácidas, a hidrólise no sol ocorre rapidamente e é seguida por uma condensação lenta, logo, soluções ácidas são mais estáveis, sendo mais fácil obter filmes homogêneos e compactos (SAKAI et al., 2012; XUE et al., 2013).

Para o ajuste de pH do sol, Child et al. (1999) recomendam o uso de ácido acético para a redução do pH em solução de híbridos, pois este evapora rapidamente na superfície com revestimento formado com precursores alcóxidos de silício, além disso, outros ácidos como o clorídrico e o nítrico, também utilizados para esta finalidade, podem promover corrosão no substrato (KUNST et al., 2015).

A Figura 12(a) apresenta os termogramas obtidos por TGA e a Figura 12(b) a DTG do sol TEOS/MTES após 24 h de hidrólise e do revestimento TEOS/MTES após a cura em forno mufla em 450 °C.

Figura 12 - Termogramas (a) TGA e (b) DTG do sol TEOS/MTES após hidrólise e do revestimento TEOS/MTES após a cura.



Foi observado na curva do TGA (Figura 12-a) do sol após a hidrólise dois eventos de perda de massa. O primeiro evento ocorreu em 31 °C em torno de 20% de perda, confirmado pelo pico proeminente observado na sua DTG (Figura 12-b), e o segundo evento aconteceu aos 59 °C em torno de 65% de perda, também confirmada no pico observado na sua DTG (Figura 12-b). Essas perdas de massa, totalizando 85% da amostra, foram atribuídas segundo Criado et al. (2014) e Yang et al. (2009), a evaporação dos solventes presentes no sol, tais como etanol, água e ácido acético.

Considerando-se a formulação do sol de TEOS/MTES, observou-se que após a evaporação dos solventes, cerca de 15% do sol está remanescente, referente ao TEOS/MTES hidrolisado. Este resultado indicou que para a próxima etapa, a cura com temperatura de 450 °C é suficiente para remoção completa dos solventes.

Para o filme TEOS/MTES após a cura em mufla na temperatura de 450 °C verificou-se por TGA e DTG (Figura 12-a,b) confirmada pelo sua DTG (Figura 12-b) uma excelente estabilidade térmica, sem observação de eventos de perda de massa, o que pode estar relacionado a formação da rede de ligações siloxanos densa e reticulada. Não foram observados estágios de degradação térmica em nenhuma temperatura, este resultado comprova que a temperatura de cura utilizada, após a aplicação do filme sobre

o substrato, proporcionou uma completa eliminação dos solventes e reticulação do filme, uma vez que se assegurou a sua integridade em temperaturas inferiores a 600 °C.

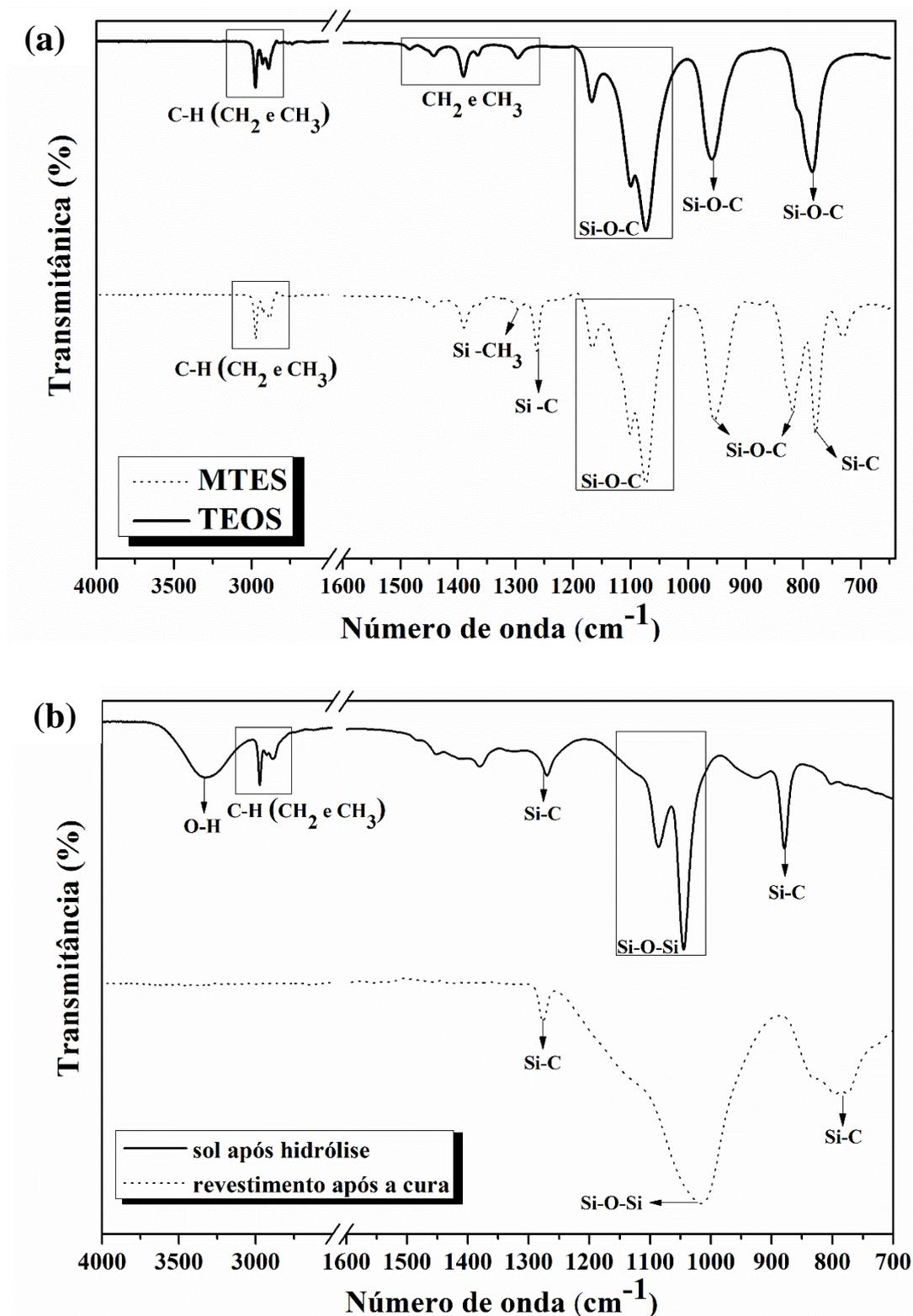
Innocenzi et al. (1994) avaliaram o comportamento do revestimento TEOS/MTES na proporção molar 40:60, submetido a diferentes temperaturas de cura. Os autores concluíram que a temperatura de 450 °C foi a temperatura máxima possível de ser utilizada na cura do revestimento para que se obtenha o mais alto grau de sinterização da rede inorgânica, apresentando uma rede mais compacta de caráter plástico e mantendo a funcionalidade dos grupos metila (CH₃).

A Figura 13(a) apresentou espectros no FTIR dos precursores alcóxidos de silício TEOS e MTES puros, com uma quebra de eixo que foi adicionada entre 2500 e 1600 cm⁻¹, uma vez que não se verificou a presença de bandas nesta faixa medida. O espectro no infravermelho do precursor TEOS puro apresentou bandas em 2977, 2920 e 2886 cm⁻¹, correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo funcional C-H (CH₂ e CH₃), e as bandas presentes entre 1490 a 1290 cm⁻¹ correspondem à deformação angular e dobramento dos grupos CH₂ e CH₃. As bandas em 1167, 1101, 1073, 960 e 786 cm⁻¹ corresponderam ao estiramento Si-O das ligações Si-O-C (CRIADO et al., 2014; BARBERENA-FERNÁNDEZ et al., 2015). O espectro no infravermelho do precursor MTES puro também apresentou bandas em 2977, 2920 e 2886 cm⁻¹, correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico C-H (CH₂ e CH₃). A banda em 1293 cm⁻¹ refere-se à deformação simétrica da ligação Si-CH₃ e a banda 1262 cm⁻¹ a ligação Si-C. As bandas 1167, 1103, 1072, 954, 820 cm⁻¹ correspondem às ligações Si-O-C (CRIADO et al., 2014).

A Figura 13(b) apresentou os espectros de FTIR do sol TEOS/MTES após a hidrólise e dos filmes após a cura em mufla, com uma quebra de eixo que foi adicionada entre 2500 e 1600 cm⁻¹, uma vez que não se verificou a presença de bandas nesta faixa medida. O espectro no infravermelho do sol após a hidrólise apresentou uma banda em 3327 cm⁻¹ correspondente a deformação axial das ligações O-H. As bandas ente 2975 e 2875 cm⁻¹ são correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo funcional C-H (CH₂ e CH₃) e as bandas 1276 e 879 cm⁻¹ são referentes à presença das ligações Si-C. As bandas visualizadas em 1083 e 1045 cm⁻¹ são referentes às ligações siloxanos (Si-O-Si) (LATTHE et al., 2009; CUI et al., 2011; CRIADO et al., 2014). O espectro no FTIR do sol após sua cura em mufla apresentou as bandas 1276 e 792 cm⁻¹,

que correspondem às ligações Si-C. E a banda 1019 cm^{-1} corresponde ao alongamento assimétrico da ligação Si-O-Si.

Figura 13 - Espectros no FTIR: (a) dos precursores alcóxidos de silício TEOS e MTES puros e (b) sol após hidrólise e revestimento após a cura.

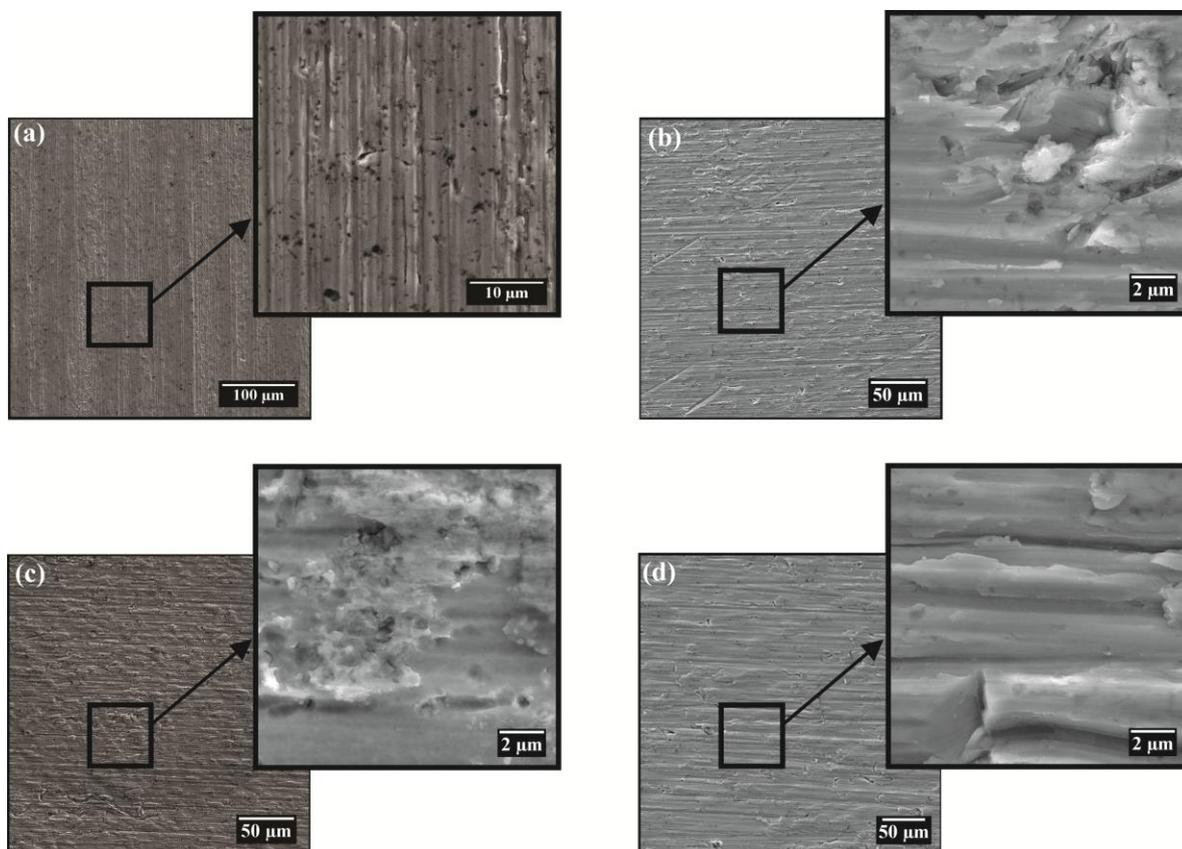


Na comparação entre os espectros da Figura 13, observou-se a ausência da banda 3327 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações O-H. Este resultado confirma o que foi observado no TGA (Figura 12), indicando que os solventes (água e álcool) e o ácido acético foram removidos, atestando a cura completa do filme. Do mesmo modo, foi verificada a ausência das bandas entre 2800 e 3000 cm^{-1} , referentes ao estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-H, C-H₂ e C-H₃ e também a diminuição das bandas entre 1300 e 1400 cm^{-1} , referente às deformações angulares das ligações C-H₂ e C-H₃, estes resultados indicam que o processo de cura eliminou os voláteis orgânicos (álcoois) inicialmente presentes no sol, porém enfatiza-se a permanência da banda relacionada à ligação Si-C, correspondente à Si-CH₃ (WANG et al., 2013; INNOCENZI et al., 1994). Notou-se também que após a cura houve aumento nas bandas entre 1000 e 1200 cm^{-1} correspondentes às ligações Si-O-Si. Sabe-se que durante a hidrólise ocorre a conversão de grupos silanóis (Si-O-C) em grupos siloxanos (Si-O-Si), portanto, este resultado corrobora com a hipótese de que a hidrólise, condensação e cura do filme promoveram uma reticulação completa da rede (ligações covalentes e cruzadas).

Mediante os resultados obtidos por FTIR e conforme observado na literatura (YU et al., 2015), propôs-se o mecanismo das reações para formação do revestimento TEOS/MTES, que acontece de acordo com o apresentado na Figura 14.

Na Figura 14(a) foi observado que por meio da reação de hidrólise dos precursores alcóxidos de silício em uma mistura de água/álcool, ocorreu à quebra das ligações das ramificações orgânicas, convertendo-as em ligações silanóis (Si-OH). Na Figura 14(b) observou-se a reação entre o TEOS e o MTES hidrolisados, catalisada pelo ácido acético (CH₃COOH), onde os grupos hidroxila (OH) do TEOS uniram-se com os grupos hidroxila (OH) do MTES, formando pontes de hidrogênio. Na Figura 14(c) observou-se a reação após a aplicação do sol por *dip-coating* no substrato, onde os grupos silanos remanescentes se adsorvem sobre a superfície do metal através de ligações de hidrogênio. Em seguida (Figura 14-d) durante o processo de cura a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$, a água, o etanol e o ácido acético evaporaram e as ligações covalentes siloxano-metálicas e o excesso de grupos silanol reticularam formando uma rede de siloxano (Si-O-Si) (KREGIEL, 2014).

Figura 15 - Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG das superfícies dos revestimentos híbridos TEOS/MTES aplicados sobre os substratos submetidos aos diferentes pré-tratamentos: (a) Ti; (b) Ti/P; (c) Ti/K e (d) Ti/N.



Na Figura 15(a) verificou-se que o substrato Ti possui uma superfície metálica heterogênea, com irregularidades superficiais inerentes do processo de lixamento. Além disso, observou-se na Figura 15(c) que a amostra tratada com solução Kroll apresentou irregularidades em sua superfície, apresentando uma superfície heterogênea. A amostra tratada com solução Piranha (Figura 15-b), também apresentou irregularidades na superfície.

Os pré-tratamentos ácidos permitiram a obtenção de superfícies com microtopografias com diferentes orientações, em virtude da variada velocidade de ataque de grãos e subgrãos do titânio (SITTIG, 1999; BEHNAMGHDER, 2008). Com o uso dos pré-tratamentos ácidos pode ocorrer também a formação de pites na superfície, em função do tempo de aplicação, concentração, volume e temperatura do ácido determinando a profundidade destes. Além disso, para a realização de ataques ácidos em titânio, deve ser levado em conta, a sua possível fragilização, ocasionada pela

incorporação de hidrogênio ao material, advinda das reações do ácido com o óxido, resultando na possível formação de microtrincas na superfície, podendo reduzir a resistência à fadiga do material, acarretando na ocorrência de fraturas (GUÉHENNEC et al., 2007).

A amostra tratada com solução alcalina NaOH (Figura 15-d), apresentou a superfície com menos irregularidades superficiais quando comparadas as outras superfícies tratadas com as soluções de kroll e piranha. Estudos mostraram que a utilização de pré-tratamento alcalino à temperatura ambiente em metais, proporcionou a remoção de impurezas superficiais, além de estimular a formação de uma fina camada passivadora rica em hidroxilas em sua superfície (VAN OOIJ et al., 2005; DEFLORIAN et al., 2006).

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios do ângulo de contato, obtidos pelo método da gota séssil, para as amostras estudadas. A análise dos resultados possibilitou afirmar que todas as amostras estudadas possuem uma superfície com caráter hidrofílico, com valores de ângulo de contato inferiores a 90° (superfície com molhamento parcial), sem diferenças significativas entre os seus valores. Neste caso, essas superfícies hidrofílicas poderiam favorecer a adesão do revestimento TEOS/MTES, pois possuem maior molhabilidade e conseqüentemente o líquido terá um maior espalhamento na superfície do material (TIAB; DONALDSON, 2016).

Tabela 5 - Valores de ângulo de contato superficial médio para as amostras de Ti-Cp e Ti-Cp com os diferentes pré-tratamentos superficiais.

Amostra	Ângulo de contato (°)
Ti	60 ± 5
Ti/K	80 ± 2
Ti/P	59 ± 2
Ti/N	50 ± 2

Comparando-se somente os valores de ângulo de contato dos pré-tratamentos ácidos, Kroll e Piranha da Tabela 5, observa-se que a amostra Ti-Cp com pré-tratamento Kroll apresenta uma superfície mais hidrofóbica que a superfície pré-tratada com Piranha. Isso pode estar associado ao fato de que o Kroll é utilizado para remover o óxido nativo e contaminações da superfície, tornando-a limpa e uniforme.

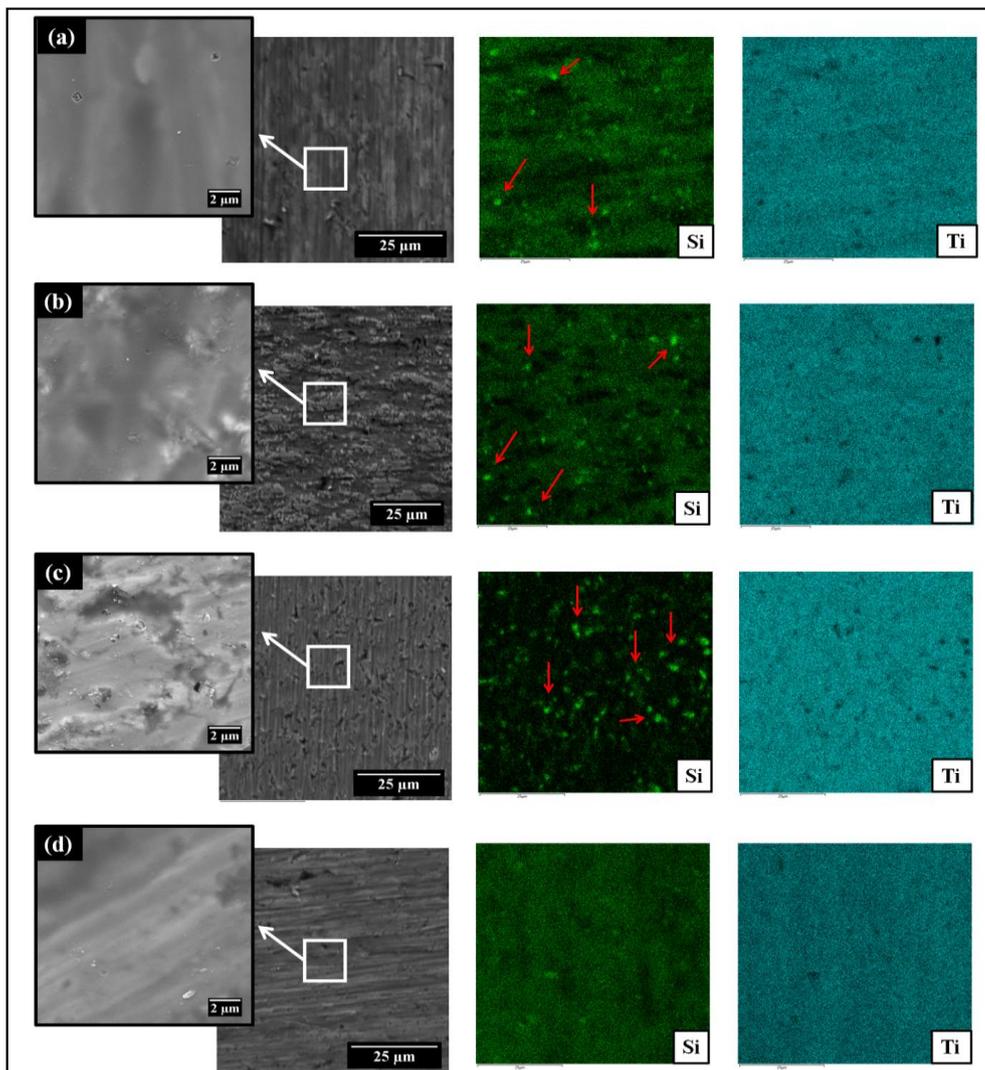
A superfície pré-tratada com NaOH (Tabela 5) apresenta o menor valor de ângulo de contato, evidenciando uma superfície mais hidrofílica, isso ocorre devido a formação de uma camada passivadora rica em hidroxilas, além da remoção de impurezas superficiais. Segundo Medeiros et al., 2012, essa característica hidrofílica é consequência da remoção do óxido de titânio presente em sua superfície, que promove um aumento na energia livre superficial.

5.3 Caracterização das superfícies com revestimentos de precursores alcóxidos de silício aplicados após o pré-tratamento – Etapa 1

A Figura 16 apresenta as micrografias de topo obtidas por MEV-FEG da superfície das amostras sem e com pré-tratamento, com posterior aplicação do filme híbrido TEOS/MTES. Analisando a morfologia da superfície da amostra Ti/TM (Figura 16-a), observa-se um filme com cobertura homogênea e sem fissuras aparentes. Para a amostra Ti/K/TM (Figura 16-b), foi observado um filme sem fissuras, mas com várias irregularidades (indicadas por setas). Estas irregularidades (descontinuidades) são uma consequência da morfologia heterogênea apresentada em sua superfície, visualizada na Figura 15(c), evidenciando que o pré-tratamento pode ter influenciado na distribuição do filme híbrido, formando acúmulos de deposição de sol nestes locais.

Na amostra Ti/P/TM (Figura 16-c), foi observado um filme sem fissuras aparentes, porém com heterogeneidades (descontinuidades) e a presença de aglomerados por toda superfície. A formação destes acúmulos pontuais pode ter ocorrido durante a reação de condensação do filme, devido à precipitação de SiO_2 . A heterogeneidade da superfície do substrato pré-tratado observado na Figura 15(b), pode ter influenciado na cobertura da superfície pelo filme, pois observa-se a formação de poros superficiais, que auxiliam no acúmulo de sol nestes locais. Na amostra Ti/N/TM (Figura 16-d), observou-se um recobrimento regular e sem fissuras aparentes.

Figura 16 - Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG e mapeamento por EDS para a superfície das amostras com e sem pré-tratamento, com aplicação do filme híbrido TEOS/MTES: (a) Ti/TM; (b) Ti/K/TM; (c) Ti/P/TM e (d) Ti/N/TM.



A Figura 16 também apresenta o mapeamento por EDS das superfícies das amostras estudadas. Na amostra Ti/TM (Figura 16-a), foi possível observar a presença de regiões com formação de acúmulos pontuais que podem ter ocorrido durante a reação de condensação dos filmes, devido à precipitação de aglomerados com maior concentração de Silício.

Nas amostras Ti/K/TM (Figura 16-b) e Ti/P/TM (Figura 16-c) foi possível observar a presença de regiões com maior concentração de Silício sobre as suas superfícies (indicadas por setas). A formação destes acúmulos pontuais pode ter ocorrido devido à precipitação de aglomerados, além de ser uma consequência da morfologia heterogênea apresentada em suas superfícies, visualizada nas Figuras 15-c,b,

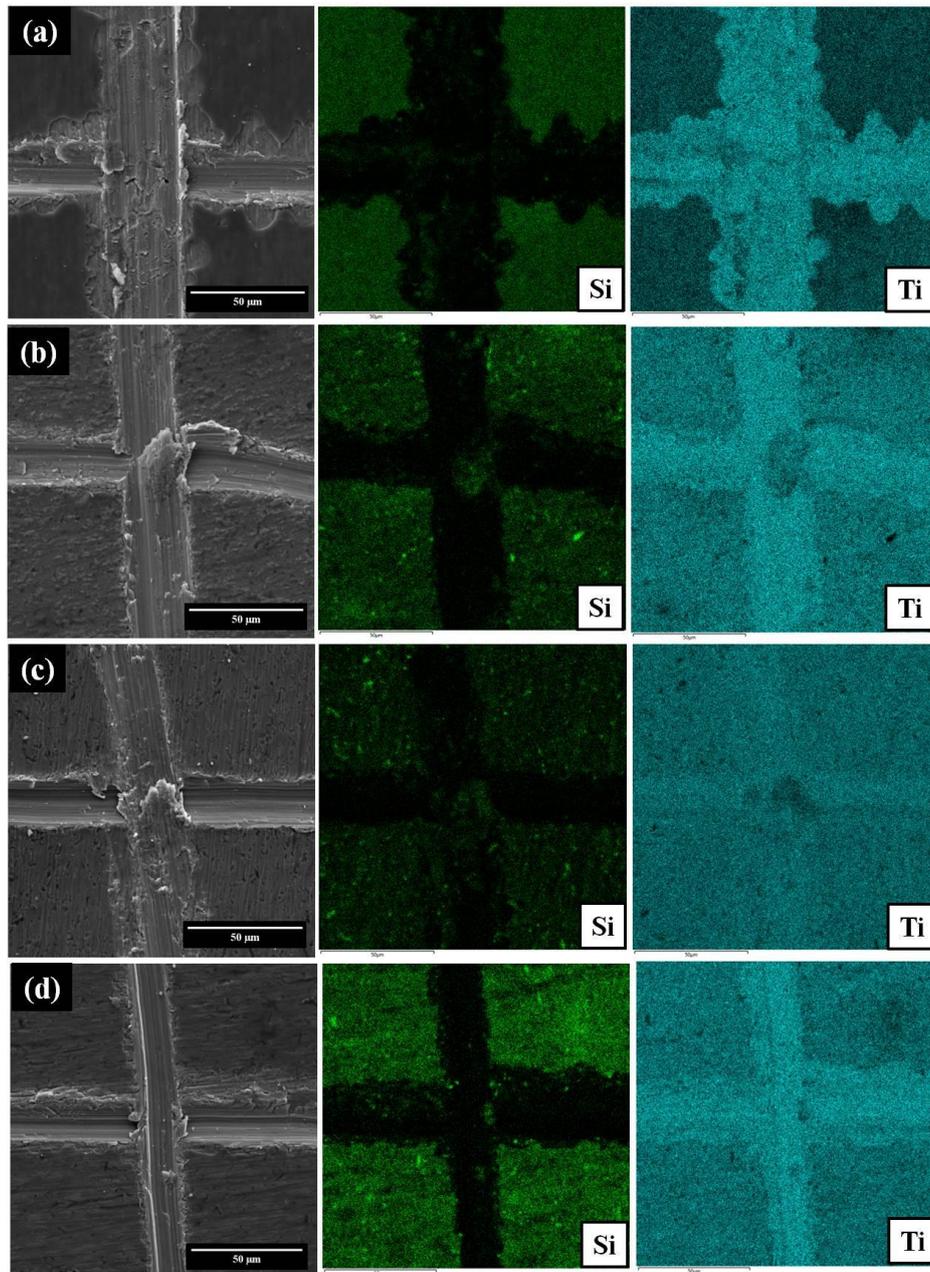
evidenciando que os pré-tratamentos podem ter influenciado na distribuição do filme híbrido, formando ilhas de deposição mais intensa do mesmo. Na amostra Ti/N/TM (Figura 16-d) observa-se a presença de Silício distribuído uniformemente por toda a superfície das amostras, indicando que o filme é homogêneo e regular, confirmando o completo recobrimento do substrato, conforme observado na Figura 15(d). A alta intensidade do sinal Titânio na varredura do EDS indica que todos os filmes estudados apresentam uma baixa espessura, permitindo que o feixe de elétrons os ultrapasse e detecte também os elementos presentes no substrato Ti-Cp.

A Figura 17 apresenta os mapeamentos por EDS obtidos para a amostra com e sem pré-tratamento, com posterior aplicação do revestimento híbrido TEOS/MTES, após o ensaio de adesão.

As amostras Ti/K/TM (Figura 17-b) e Ti/P/TM (Figura 17-c) apresentaram resultados semelhantes e a classificação de adesão obtida para ambas foi de 2B (área percentual removida de 15-35%). Observou-se uma área onde a incisão do ensaio de adesão foi realizada e os revestimentos foram removidos, ambas as amostras demonstraram um pequeno deslocamento do revestimento (na região adjacente a incisão). Verificou-se que após a remoção da fita, os revestimentos permaneceram parcialmente aderidos ao substrato devido a fraca adesão à superfície do substrato, isto pode ser observado pela baixa intensidade do sinal do elemento Si (coloração verde).

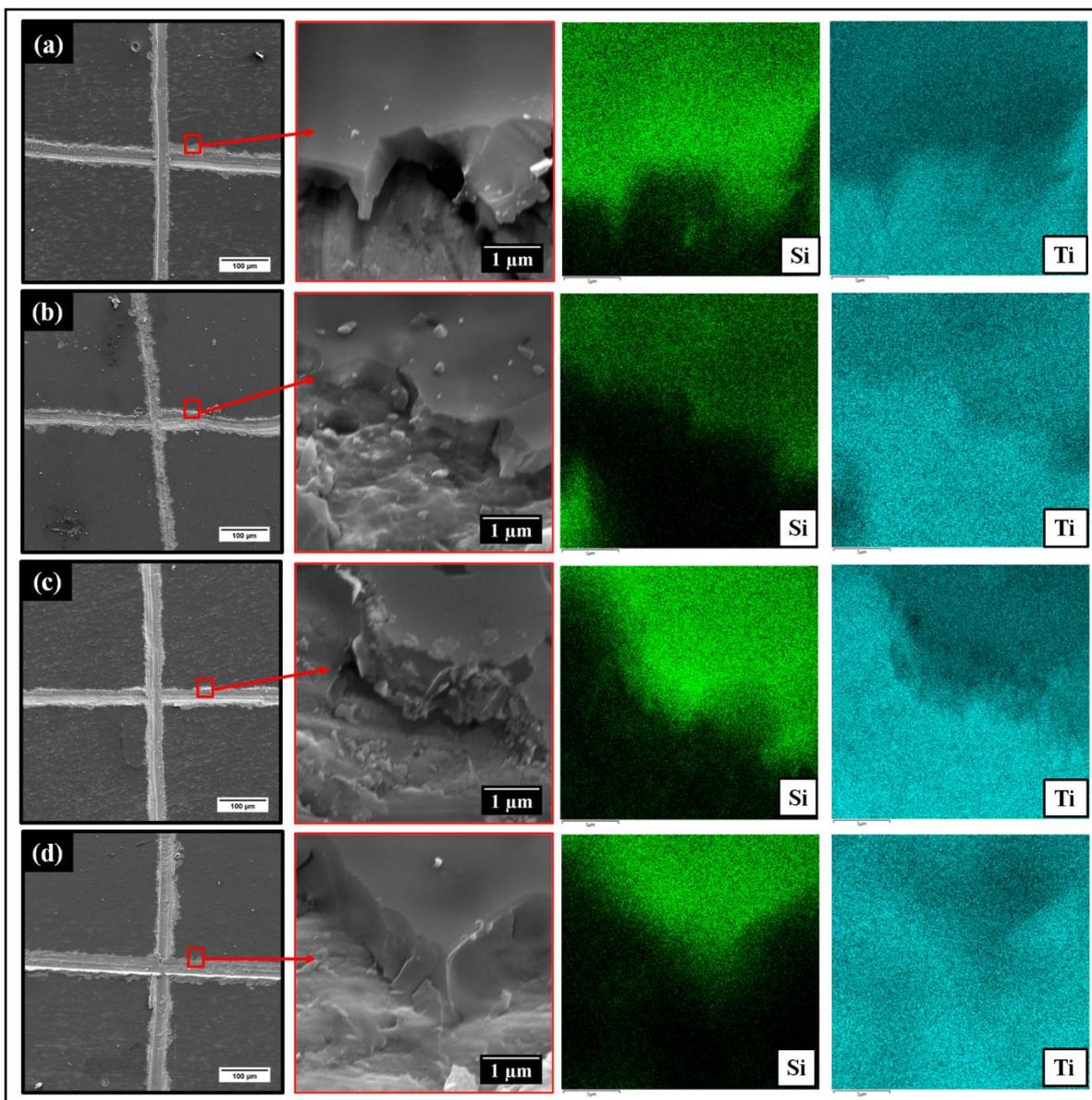
As amostras Ti/TM (Figura 17-a) e Ti/N/TM (Figura 17-d) apresentaram classificação de adesão de 3B (área percentual removida de 5-15%), pois observou-se o arrancamento do revestimento nas mediações da região da incisão realizada durante o teste de adesão, porém nas regiões distantes da trilha, o revestimento permaneceu aderido ao substrato, fato observado pela significativa intensidade do sinal do elemento Si (coloração verde).

Figura 17 - Mapeamento por EDS da superfície das amostras revestidas, após o ensaio de adesão: (a) Ti/TM; (b) Ti/K/TM; (c) Ti/P/TM e (d) Ti/N/TM.



Por meio das técnicas de MEV-FEG e EDS avaliou-se criteriosamente o ensaio de adesão nas amostras com e sem pré-tratamento revestidas com filme híbrido TEOS/MTES, nas regiões próximas da incisão realizada neste ensaio (Figura 18).

Figura 18 - Mapeamento por EDS das regiões próximas das incisões realizadas no teste de adesão no revestimento híbrido TEOS/MTES: (a)Ti/TM; (b)Ti/K/TM; (c)Ti/P/TM e (d) Ti/N/TM.



Para as amostras Ti/K/TM (Figura 18-b) e Ti/P/TM (Figura 18-c) foi possível observar na região do destacamento, que os revestimentos ficaram danificados e com deslocamentos na região da incisão, demonstrando menores forças de coesão entre os filmes e o substrato. Estas fracas adesões se devem as irregularidades superficiais do substrato, provocada pelos pré-tratamentos, como já observado na Figura 15-b,c. Além disso, a fraca adesão de um revestimento pode estar associada às interações entre o grupo funcional do silano e o substrato com regiões frágeis na interface onde as fracas ligações de hidrogênio diminuem a aderência. As amostras Ti/TM (Figura 18-a) e

Ti/N/TM (Figura 18-d) apresentaram melhores resultados de adesão do filme com o substrato que as amostras Ti/K/TM (Figura 18-b) e Ti/P/TM (Figura 18-c). Ambas as amostras mostraram regularidade de cobertura do revestimento que fica evidente no mapeamento EDS, onde foi possível perceber a intensidade e distribuição homogênea de Si nas superfícies. Observou-se também que na amostra Ti/N/TM (Figura 18-d) que mesmo após o arrancamento, o revestimento permaneceu bem aderido ao substrato. Este resultado indica que o filme apresentou forte força adesiva (interação entre o filme e a superfície do substrato) e forte força coesiva (interação intermolecular do filme).

A Figura 19 apresenta as micrografias de seção transversal das amostras estudadas a fim de estimar-se a espessura do revestimento híbrido TEOS/MTES para as amostras sem e com pré-tratamentos e a partir destas micrografias foram estimados os valores médios de espessura de camada de cada revestimento (Tabela 6). Observou-se na Figura 19(d) que a amostra Ti/N/TM apresentou um filme regular e bem aderido ao substrato e com valor médio de espessura maior que as outras amostras estudadas. Constata-se também na Tabela 6 que as amostras Ti/TM, Ti/K/TM e Ti/P/TM não apresentam grande variação de valores médios de espessura entre si.

É importante ressaltar que Garcia et al. (2006) e Ballarre et al. (2009) obtiveram valores de espessura de camada para o revestimento híbrido de TEOS e MTES na ordem de $\sim 1,5 \mu\text{m}$. Estes autores evidenciaram que os revestimentos obtidos por uma única imersão no sol tem uma espessura de camada crítica, definida como a espessura máxima alcançada sem formação de fissuras no revestimento, geralmente inferior a $2,5 \mu\text{m}$, portanto analisando-se a Tabela 6, todos os filmes estariam dentro do valor aceitável para a formação de filme sem defeitos.

Figura 19 – Micrografias por MEV-FEG da seção transversal das amostras com aplicação do revestimento híbrido TEOS/MTES: (a) Ti/TM; (b) Ti/K/TM; (c) Ti/P/TM e (d) Ti/N/TM.

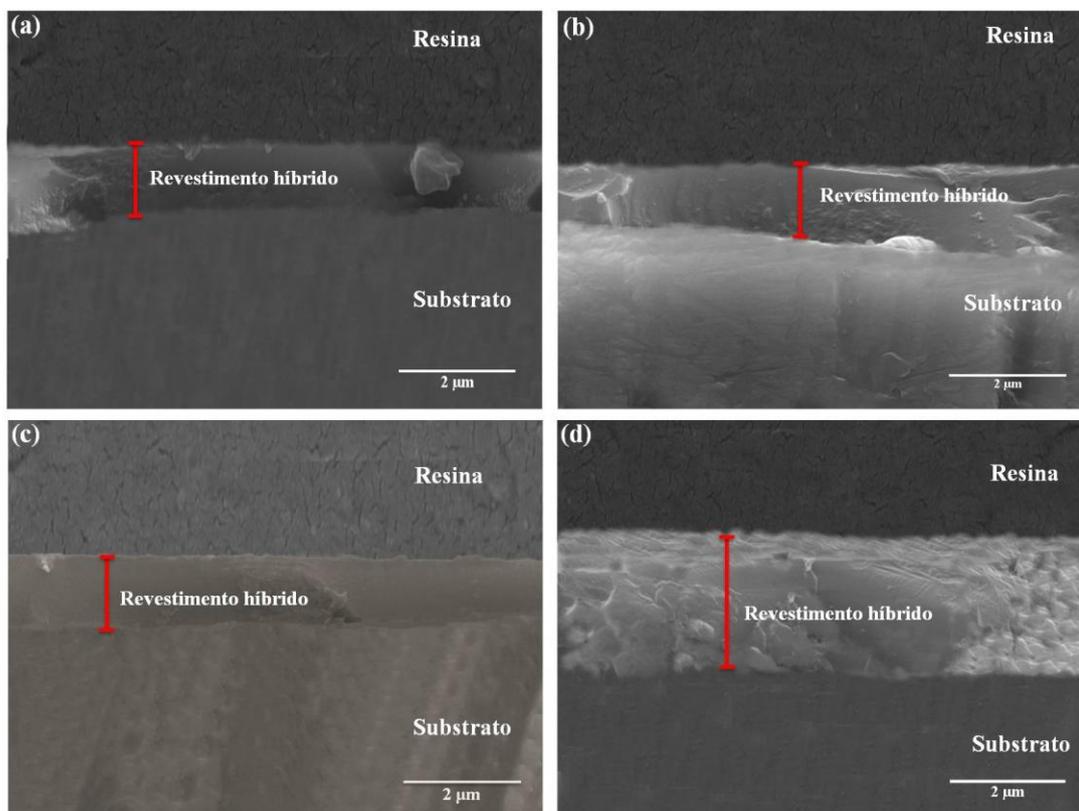


Tabela 6 – Média das espessuras de camada dos revestimentos a partir das imagens de MEV-FEG.

Amostra	Espessura do Revestimento (μm)
Ti/TM	$1,46 \pm 0,2$
Ti/K/TM	$1,53 \pm 0,3$
Ti/P/TM	$1,42 \pm 0,2$
Ti/N/TM	$2,1 \pm 0,4$

A microrugosidade da superfície das amostras foi realizada a partir dos resultados da análise de perfilometria de contato (Tabela 7).

Tabela 7 – Rugosidades médias obtidas pela análise de perfilometria.

Amostra	R_a (μm)	R_z (μm)
Ti	0,44 ± 0,03	1,35 ±0,04
Ti/TM	0,16 ± 0,03	0,74 ±0,08
Ti/K/TM	0,11 ± 0,02	0,97 ±0,09
Ti/P/TM	0,19 ± 0,02	0,88 ±0,05
Ti/N/TM	0,21 ± 0,03	0,65 ±0,02

Constatou-se que todas as amostras revestidas com TEOS/MTES apresentaram valores de R_a menores em comparação com a amostra de Ti, de acordo com o observado na Tabela 7. Este fato pode ser atribuído às ranhuras produzidas durante o processo de lixamento da amostra Ti, evidenciando então que o revestimento TEOS/MTES foi capaz de suavizar os defeitos da superfície do substrato, o que permitiu tornar mais suave o nível micrométrico (WANG et al., 2013).

Em relação aos valores de R_z, observou-se que o substrato Ti-Cp apresentou um maior valor (1,35 μm) quando comparado com as outras amostras (Tabela 7), indicando que na sua superfície a distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais profundo é maior que nas outras amostras. As amostras Ti/N/TM e Ti/TM (Tabela 7), obtiveram os menores valor de R_z, mostrando que suas superfícies são mais regulares, sem apresentar grandes diferenças nas suas distâncias verticais entre o pico mais alto e o vale mais profundo. Apesar do valor de R_z do substrato ser maior, os valores de espessuras de camada apresentadas na Tabela 6 indicaram as amostras Ti/N/TM e Ti/TM possuem revestimentos que nivelaram a superfície do substrato, visto que seus valores de espessura (2,1 e 1,46 μm) são maiores que o valor de R_z do substrato (1,35 μm).

O mesmo acontece com as amostras Ti/P/TM e Ti/K/TM (Tabela 7), que mesmo apresentando valores de R_z um pouco maiores que os das amostras Ti/N/TM e Ti/TM (Tabela 7), também possuem revestimentos que nivelaram a superfície do substrato, visto que suas espessuras de camadas apresentadas na Tabela 6 foram nos valores de 1,42 e 1,53 μm, respectivamente.

Os valores de rugosidade (Tabela 7) quando comparados aos valores de espessura de camada (Tabela 6) indicaram que todos os revestimentos foram capazes de nivelar a superfície do substrato.

A Tabela 8 apresenta os valores médios do ângulo de contato, obtidas pelo método da gota séssil, para as amostras estudadas.

Tabela 8 - Ângulo de contato médio medido para as amostras de Ti-Cp pré-tratadas e revestidas com filmes híbridos, em água.

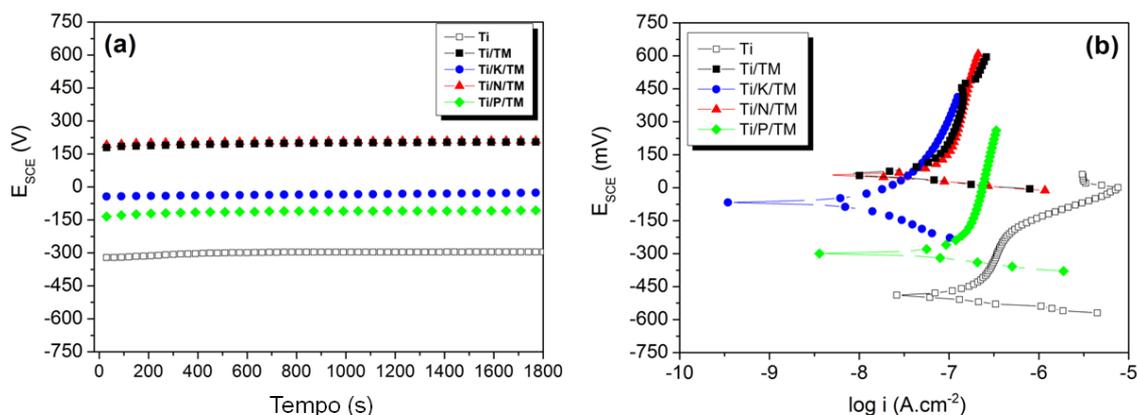
Amostra	Ângulo de contato (°)
Ti	60 ± 5,0
Ti/TM	61 ± 1,0
Ti/K/TM	84 ± 4,0
Ti/P/TM	57 ± 7,0
Ti/N/TM	51 ± 1,0

Constatou-se na Tabela 8 que após a deposição do revestimento híbrido TEOS/MTES, o menor valor de ângulo de contato, ou seja, a maior molhabilidade foi da amostra Ti/N/TM.

Shibata et al. (2015) afirmaram que superfícies hidrofílicas são mais desejáveis do que hidrofóbicas em vista de suas melhores interações com os fluídos biológicos, células e tecidos. Goriainov et al. (2014) destacam que superfícies hidrofílicas são capazes de absorver as proteínas de maneira mais flexível *in vitro*, permitindo a sua reorganização pelas células aderentes, e favorecimento da adesão e disseminação de células. Portanto os revestimentos com precursores alcóxidos são favoráveis visto que todas as amostras estudadas possuem uma superfície hidrofílica, com ângulo de contato inferior a 90°.

A fim de avaliar o efeito barreira e protetivo do revestimento estudado, testes eletroquímicos foram realizados. Na Figura 20-a, observa-se que o potencial de circuito aberto (OCP) se manteve estável ao longo do tempo do ensaio para todas as amostras estudadas. Todas as amostras recobertas com revestimento híbrido, independentemente do pré-tratamento aplicado, apresentaram OCP final superior ao da amostra sem revestimento (Ti). Este resultado indica que o revestimento TEOS/MTES protege o substrato metálico durante o tempo de ensaio, atuando como uma barreira protetiva que eleva o potencial da amostra para valores menos ativos. Dentre as amostras revestidas, observa-se que os pré-tratamentos ácidos (Ti/K/TM e Ti/P/TM) apresentaram potencial final inferior aos das amostras Ti/TM e Ti/N/TM.

Figura 20 - (a) Monitoramento de OCP e (b) curvas de polarização para as amostras estudadas em solução SBF.



Analogamente ao observado do monitoramento de OCP, as curvas de polarização (Figura 20-b) mostraram que todas as amostras recobertas com revestimento híbrido apresentaram um desempenho protetivo superior ao da amostra Ti. Dentre as amostras pré-tratadas, é possível observar que a amostra Ti/N/TM apresentou baixa densidade de corrente de corrosão ($3,2 \times 10^{-8} A.cm^{-2}$) quando comparado à amostra Ti/K/TM ($1,0 \times 10^{-7} A.cm^{-2}$) e a amostra Ti/P/TM ($7,5 \times 10^{-7} A.cm^{-2}$). Este comportamento pode estar associado a presença do revestimento híbrido compacto (Figura 19), que impede a passagem e dissolução dos íons agressivos presentes no eletrólito. Assim, este resultado confirma que a solução de NaOH promoveu mudanças na superfície do titânio, formando um óxido com maior rugosidade e molhabilidade (Tabela 5), fato que favoreceu a formação de um revestimento híbrido homogêneo, bem aderido e mais espesso, conforme observado nas Figuras 16(d), 18(d) e 19(d), respectivamente. Essas características morfológicas do revestimento híbrido favorecem a sua ação de barreira física protetora.

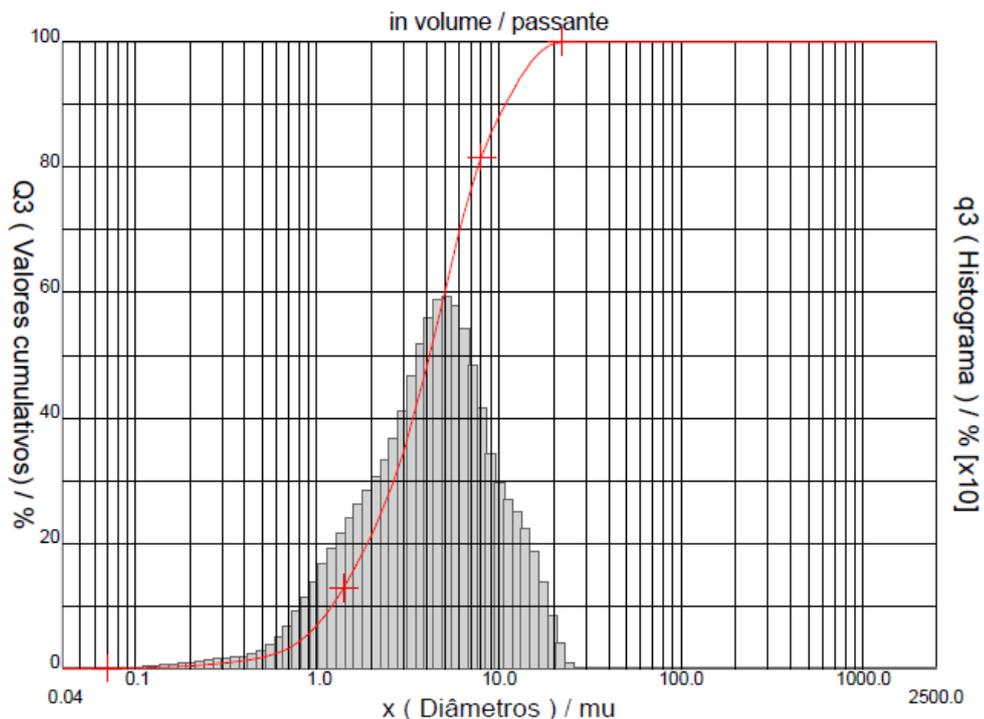
As amostras pré-tratadas com soluções ácidas (Ti/K/TM e Ti/P/TM) apresentaram um desempenho protetivo inferior ao da amostra Ti/N/TM. Este resultado pode estar associado a remoção do óxido nativo da superfície, provocado pela ação dos tratamentos ácidos com solução Kroll e piranha (SOBIESZCZYK et al, 2010; ZHOU et al.,2016). Além disso, estes tratamentos promoveram a formação de revestimentos com morfologias específicas, acúmulos de silício, fraca adesão e com menores espessuras, conforme observado nas Figuras 16, 18 e 19, respectivamente.

Estes resultados comprovam a ampla interação entre as características do substrato e revestimento aplicado. Com isso, pode-se afirmar que as modificações provocadas pelo tratamento alcalino (NaOH) aumentaram a resistência à corrosão da amostra de titânio, diminuindo a sua suscetibilidade à corrosão.

5.4 Caracterização das partículas da hidroxiapatita (HA) - Etapa 2

A distribuição granulométrica da hidroxiapatita foi determinada por difração a laser e é apresentada na Figura 21. A curva obtida sugere a formação de aglomerados de partículas com uma larga distribuição de tamanho, sendo que o tamanho médio dos aglomerados foi de 5,15 μm e os diâmetros medianos nas frequências de 10%, 50% e 90% foram de 1,20 μm , 4,15 μm e 10,82 μm , respectivamente.

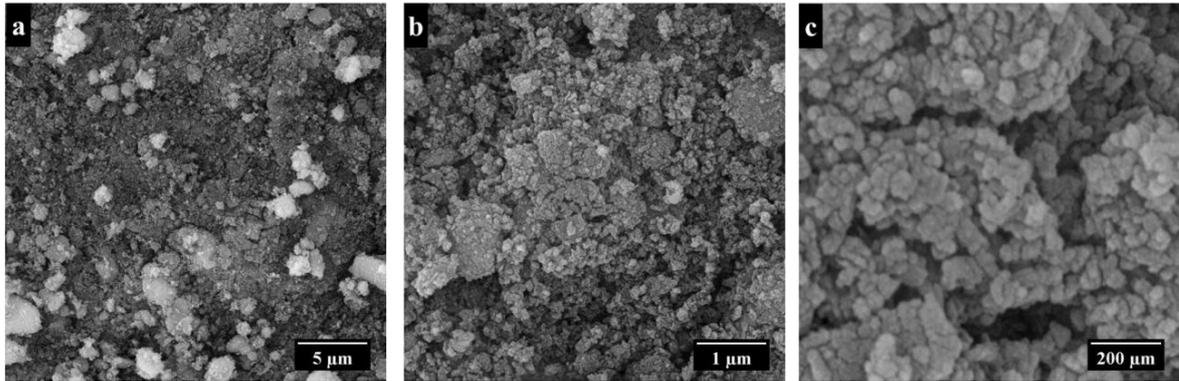
Figura 21 - Distribuição granulométrica da hidroxiapatita em pó.



A Figura 22 apresenta o resultado de caracterização morfológica da hidroxiapatita a partir da micrografia obtida por MEV-FEG, onde foi observado que a HA apresentou-se em partículas de dimensão polidispersa, com a formação de

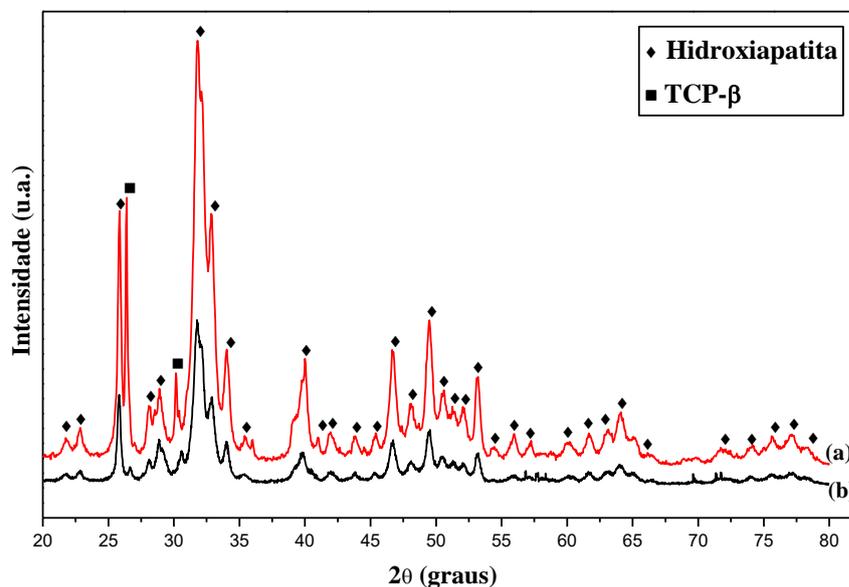
aglomerados microestruturados, o que é justificado pelo fato de que partículas pequenas tendem a se agrupar, formando partículas maiores, os aglomerados, confirmando as medidas de distribuição granulométrica da Figura 23.

Figura 22 - Micrografias das partículas de hidroxiapatita obtidas por MEV-FEG com magnificação original de: (a) 10000 x; (b) 50000 x; (c) 250000 x.



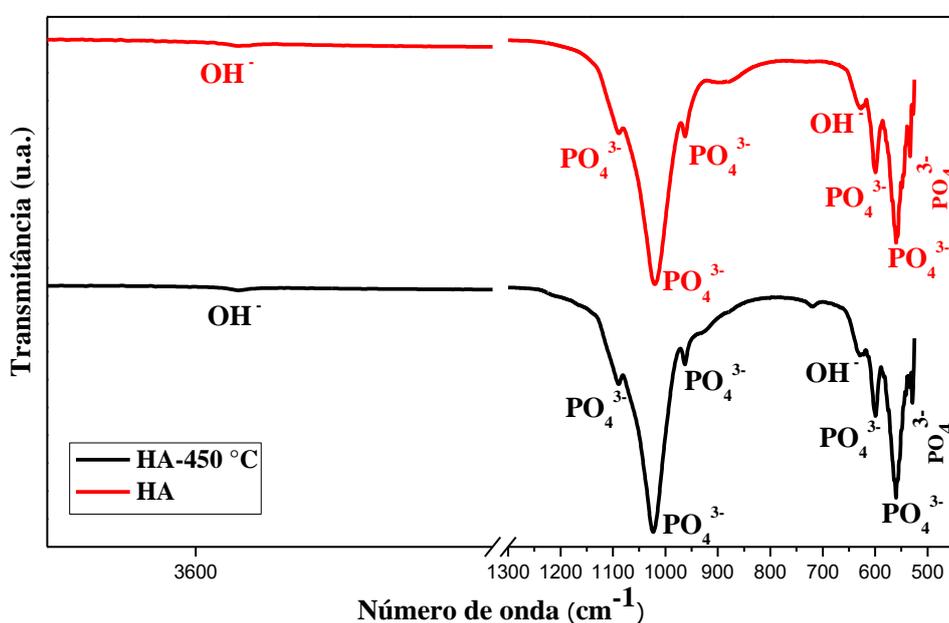
A Figura 23 apresenta o difratograma de raios X para a: (a) hidroxiapatita em pó e a (b) para a hidroxiapatita em pó calcinada a 450°C. Não se observou modificação das fases cristalinas após a calcinação a 450°C. A estrutura majoritariamente observada foi a fase cristalina foi a hidroxiapatita, conforme comparação com a ficha JCPDS #09-0432 (ANEXO 1), sendo os picos característicos (2θ) de maior intensidade: 25,87°; 31,77°; 39,81°; 46,71° e 49,46°. Observa-se também a fase fosfato tricálcico (TCP- β), segundo ficha JCPDS #01-086-1585 (ANEXO 2) visto que a hidroxiapatita utilizada neste trabalho possui em sua formulação $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Figura 23 - Difração de raios X: (a) hidroxiapatita; (b) hidroxiapatita calcinada a 450 °C.



A Figura 24 apresenta os espectros de FTIR da hidroxiapatita em pó e da hidroxiapatita calcinada a 450 °C. Não se observou modificação das fases cristalinas após a calcinação a 450°C. As bandas em 3572 e 630 cm⁻¹ surgem dos modos de alongamento e vibração, respectivamente, dos íons OH⁻ da estrutura de hidroxiapatita. As bandas 964, 1049 e 1089 cm⁻¹ correspondem às vibrações do estiramento dos íons fosfato (PO₄)³⁻. As bandas de 561-601 cm⁻¹ correspondem a vibração simétrica do alongamento P-O, referente aos íons PO₄³⁻ (TROMMER et al. 2007; FATHI et al., 2008; SIDANE et al., 2015; LEENA et al., 2016).

Figura 24 - Espectros no FTIR da hidroxiapatita em pó e hidroxiapatita em pó calcinada a 450 °C.



5.5 Caracterização do sol com partículas de hidroxiapatita - Etapa 2

O valor de viscosidade do sol com a presença da HA após 24 h de hidrólise foi de $3,26 \pm 0,051$ cP e após 48 h foi de $3,26 \pm 0,052$ cP. Comparando-se esses valores com o do sol sem a presença das partículas de HA (2,57 cP) foi observado que a adição da HA aumentou o valor da viscosidade (26,85%), o que já era esperado, visto que adição de partículas torna o sol mais viscoso. Também foi constatado que as viscosidades se mantiveram estáveis ao longo de 48 h. García et al. (2004) encontraram valores semelhantes na viscosidade de sol-gel com a adição de 10% de partículas cerâmicas (em torno de 3,8 cP após 50 h).

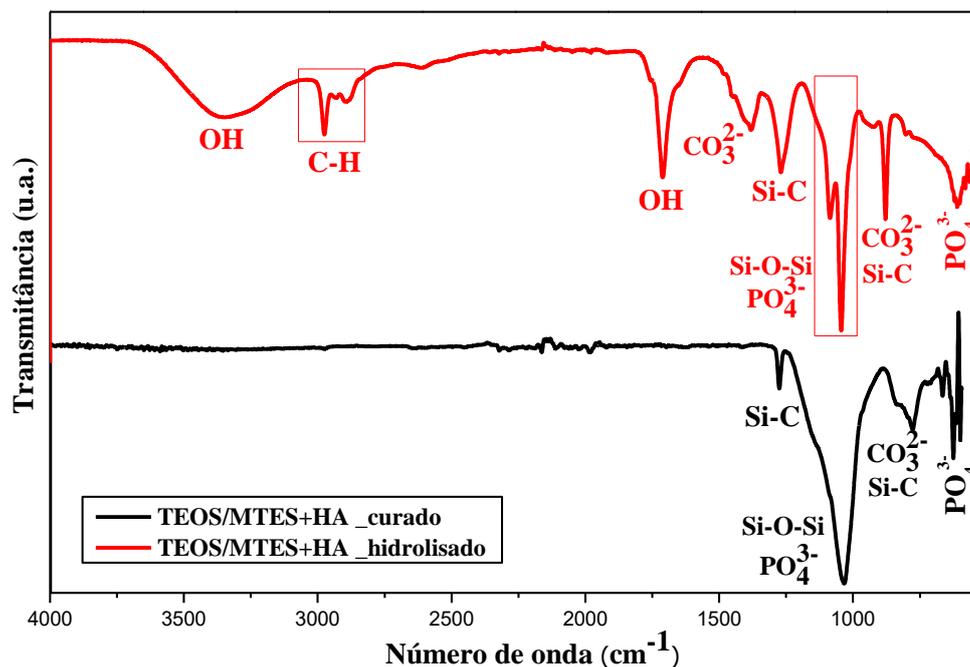
A Figura 25 apresenta os espectros de FTIR do sol TEOS/MTES com a adição das partículas de HA após 24 h de hidrólise e do sol TEOS/MTES com a adição das partículas de HA após a cura a 450°C.

O espectro no infravermelho do sol após a hidrólise (Figura 25) apresentou uma banda em 3327 cm^{-1} e uma em 1710 cm^{-1} correspondentes a deformação axial das ligações O-H, que constitui a estrutura cristalina da hidroxiapatita, além de serem atribuídas também ao OH do sol (equivalentes aos solventes água e álcool). As bandas 875, 1500 a 1350 cm^{-1} revelaram a presença do grupo carbonato (CO_3^{2-}), a banda 875 cm^{-1} também corresponde à presença das ligações Si-C. As bandas entre 2975 e 2875 cm^{-1} são correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo funcional C-H (CH_2 e CH_3). A banda 1276 cm^{-1} é referente à presença das ligações Si-C. O estiramento e deformação dos grupos PO_4^{3-} são revelados nas bandas entre 1200 a 1000 cm^{-1} , que também pode ser atribuídos as ligações siloxanos (Si-O-Si) do sol TEOS/MTES. As bandas em 602, 567 e 914 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramentos e flexões dos grupos fosfato (PO_4^{3-}), devido à presença da HA no sol. O estiramento e deformação dos grupos PO_4^{3-} são revelados nas bandas entre 1197 a 980 cm^{-1} , que também pode ser atribuído as ligações siloxanos (Si-O-Si) do sol TEOS/MTES. As bandas 1277 e 785 cm^{-1} foram atribuídas a vibração da ligação Si-C da estrutura do polissiloxano do sol (TROMMER et al. 2007; FATHI et al., 2008; LATTHE et al., 2009; CUI et al., 2011; CRIADO et al., 2014; SIDANE et al., 2015; LEENA et al., 2016).

Após a cura a 450 °C (Figura 25) mantiveram-se as bandas 875, 1500 a 1350 cm^{-1} referentes a presença do grupo carbonato (CO_3^{2-}) e a banda 875 cm^{-1} corresponde à presença das ligações Si-C. As bandas entre 1197 a 980 cm^{-1} atribuídos aos grupos PO_4^{3-} e as ligações siloxanos (Si-O-Si) e as bandas 1277 e 785 cm^{-1} atribuídas a vibração da ligação Si-C também permaneceram após o processo de cura.

Na comparação dos espectros da Figura 25, observou-se a ausência das bandas 1710 e 3327 cm^{-1} correspondentes a deformação axial das ligações O-H. Este resultado indica que os solventes (água e álcool) e o ácido acético foram removidos, atestando a cura completa do revestimento.

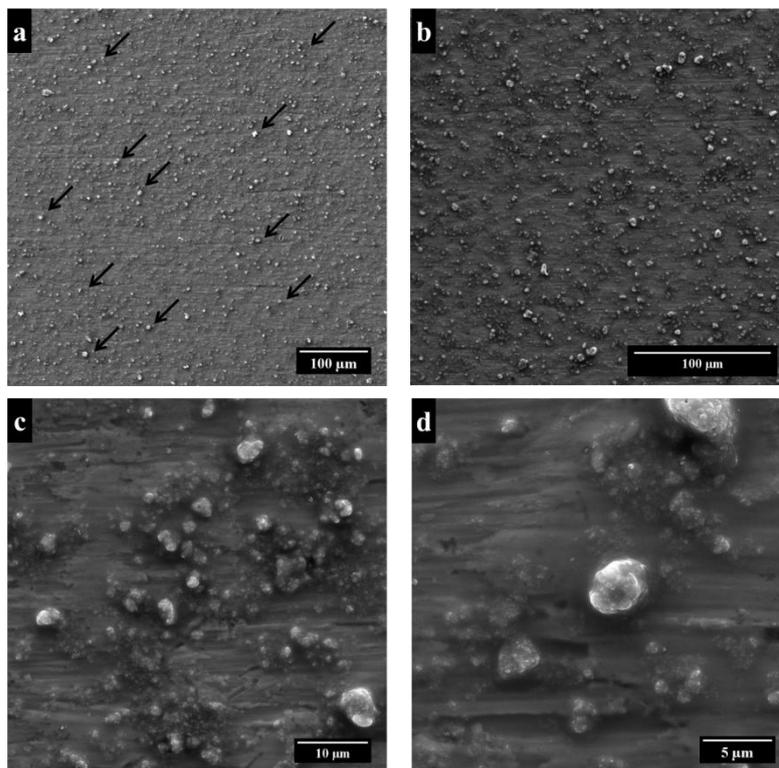
Figura 25 - Espectro no FTIR do sol TEOS/MTES com partículas de HA após a hidrólise e após a cura a 450 °C.



5.6 Caracterização das superfícies com o revestimento híbrido com hidroxiapatita - Etapa 2

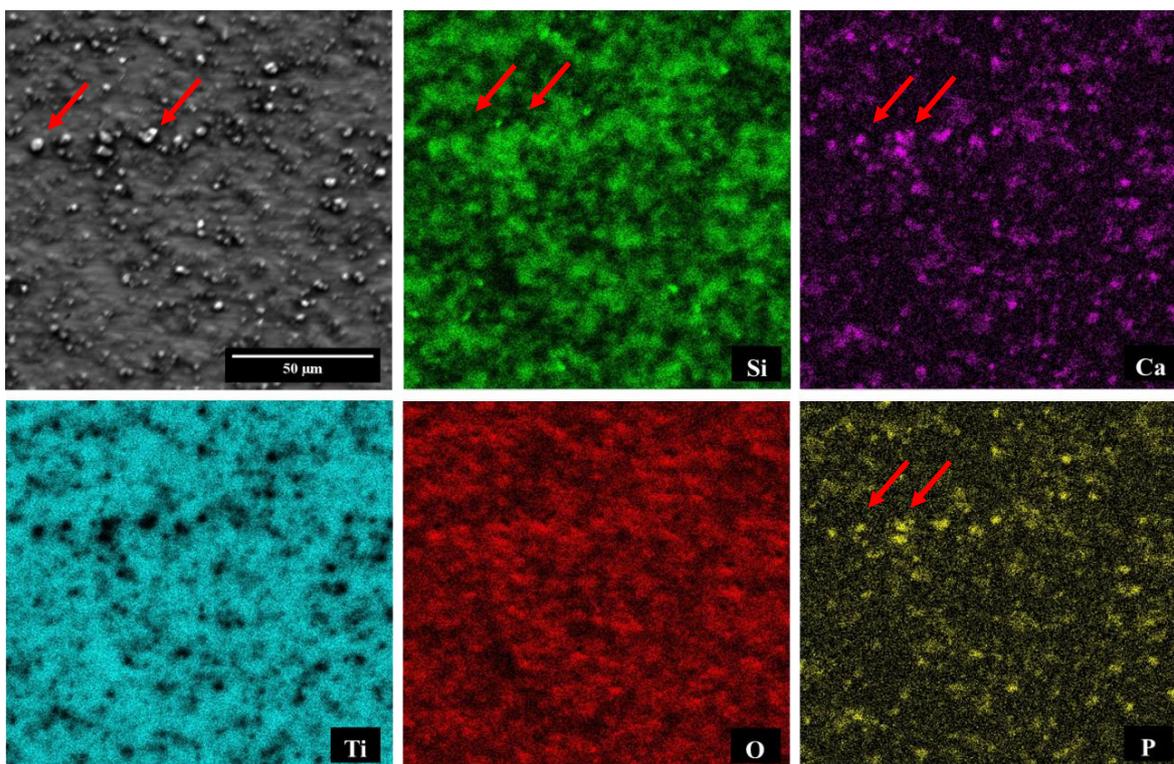
A Figura 26 apresenta as micrografias de topo obtidas por MEV-FEG da superfície das amostras com aplicação do filme híbrido TEOS/MTES com a adição da HA em diferentes magnificações. Analisando a morfologia da superfície da amostra Ti/N/TM/HA, observou-se um filme com cobertura regular e sem fissuras aparentes com a presença das partículas de HA (indicadas por setas) (Figura 26-a). Foi possível observar também que as partículas de HA incorporadas apresentaram uma distribuição de tamanho bimodal, sendo os valores médios de 4 e 10 μm (Figura 26-b,c). Segundo García et al. (2005) que estudou a distribuição de partículas cerâmicas ($\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$) no revestimento sol TEOS/MTES, quando essas partículas aparecem separadas umas das outras com distribuição uniforme ao longo de todo o revestimento, isto demonstra a estabilidade e a homogeneidade da suspensão no sol.

Figura 26 - Micrografias de topo obtidas por MEV-FEG para a superfície das amostras com aplicação do filme híbrido TEOS/MTES com a adição da HA, com magnificação original: (a) 500x; (b) 1000x; (c) 5000x; (d) 10000x.



A Figura 27 apresenta o mapeamento por EDS da superfície da amostra Ti/N/TM/HA. O mapeamento indicou a presença dos elementos silício (Si) e oxigênio (O), os principais constituintes da ligação siloxano, confirmando que o revestimento TEOS/MTES foi depositado. Observou-se também que os pontos (indicados por setas) no mapeamento dos elementos Si, O e Ti possuem sinal mais intenso no mapeamento dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) (indicados por setas) principais constituintes da HA, demonstrando que esses pontos são de fato aglomerados de hidroxiapatita incorporada no revestimento. No mapeamento dos elementos Ca e P verifica-se que a HA está distribuída sobre toda a superfície revestida do substrato Ti-Cp, porém existem aglomerados de partículas com diferentes tamanhos, corroborando com os resultados observados na Figura 26.

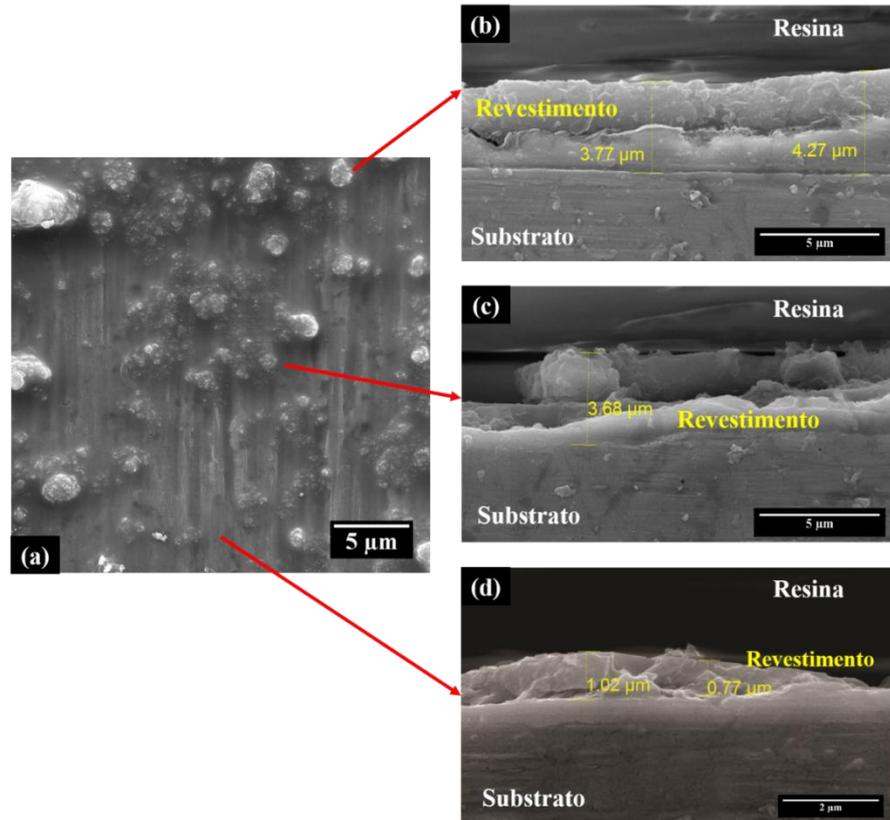
Figura 27 - Mapeamento por EDS da superfície da amostra com aplicação do filme híbrido TEOS/MTES e adição da HA.



A Figura 28(a) apresenta uma micrografia de topo da amostra Ti/N/TM/HA. As Figuras 28 (b) e (c) correspondem as micrografias de seções transversais dessa mesma amostra (Ti/N/TM/HA) que apresentaram os valores médios da espessura da camada do revestimento variando de 3,68 – 4,2 µm, em diferentes regiões de aglomerados de partículas de HA. A Figura 28(d) apresenta uma micrografia na região de seção transversal da amostra Ti/N/TM/HA correspondente a uma área sem a presença de aglomerados de partículas de HA, que mostrou valores de espessura de camada do revestimento variando de 0,77-1,02 µm. Esses resultados indicaram diferença nos valores médios de espessura do revestimento, que se justificam pela influência do acúmulo de aglomerados de HA, que nas regiões onde as mesmas estão presentes possuem valor médio superior, comparativamente às regiões onde só existe a presença do filme híbrido. García et al (2004) obtiveram valores de espessura de camada no valor médio de ~2,0 µm para um revestimento híbrido de TEOS e MTES com partículas de hidroxiapatita de diâmetro entre 5 e 8 µm. Segundo esse mesmo estudo, o valor de camada crítica para evitar defeitos nos revestimentos (fissuras) seria na ordem de ~2,5

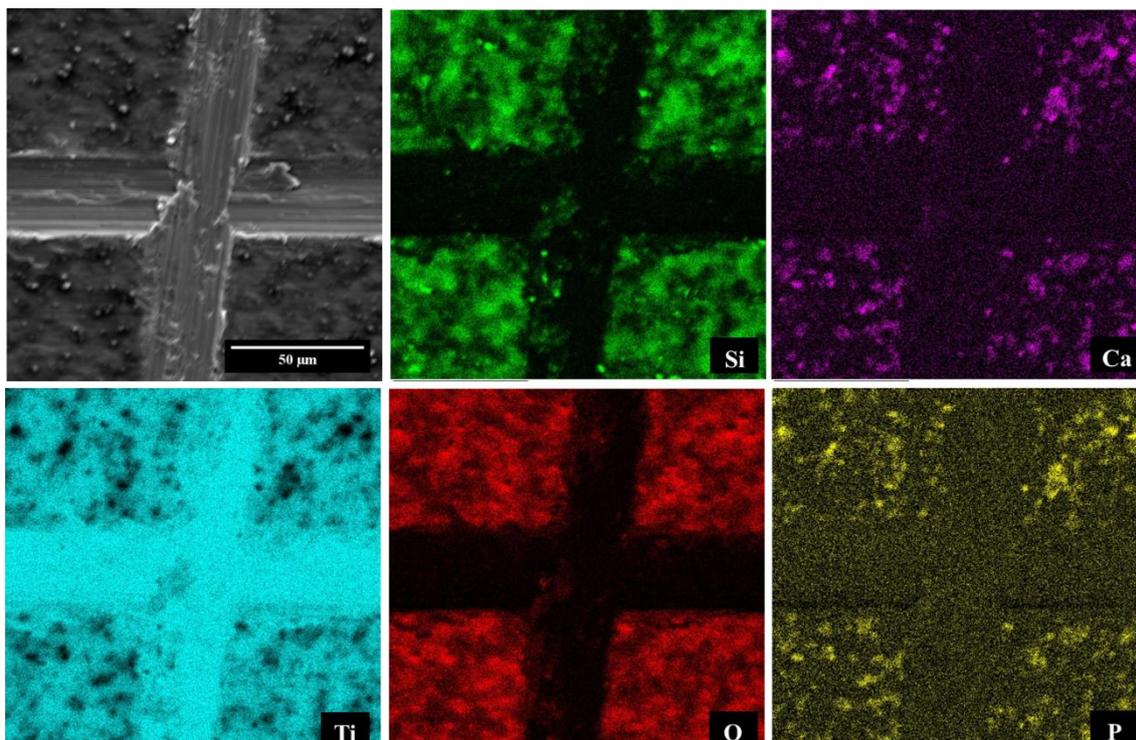
μm , o que tornaria a espessura do revestimento Ti/N/TM/HA comprometida para um valor aceitável de formação de filme sem defeitos.

Figura 28 - Micrografias obtidas por MEV-FEG de: (a) topo; (b), (c) seção transversal da superfície da amostra Ti/N/TM/HA onde existem aglomerados de HA e (d) onde não existe a presença de aglomerados de HA.



As amostras submetidas ao ensaio de adesão foram avaliadas pela técnica de EDS (Figura 29), para avaliação da adesão do revestimento Ti/N/TM/HA ao substrato Ti-Cp. Observou-se que após o ensaio de adesão, o revestimento foi removido na região da incisão, mas, contudo, permaneceu aderido ao substrato nas demais regiões. Isso pode ser constatado uma vez que ainda se observa no mapeamento de EDS a presença do revestimento, indicada pela presença dos elementos Si e O e também pela presença dos elementos Ca e P pertencentes à composição da HA.

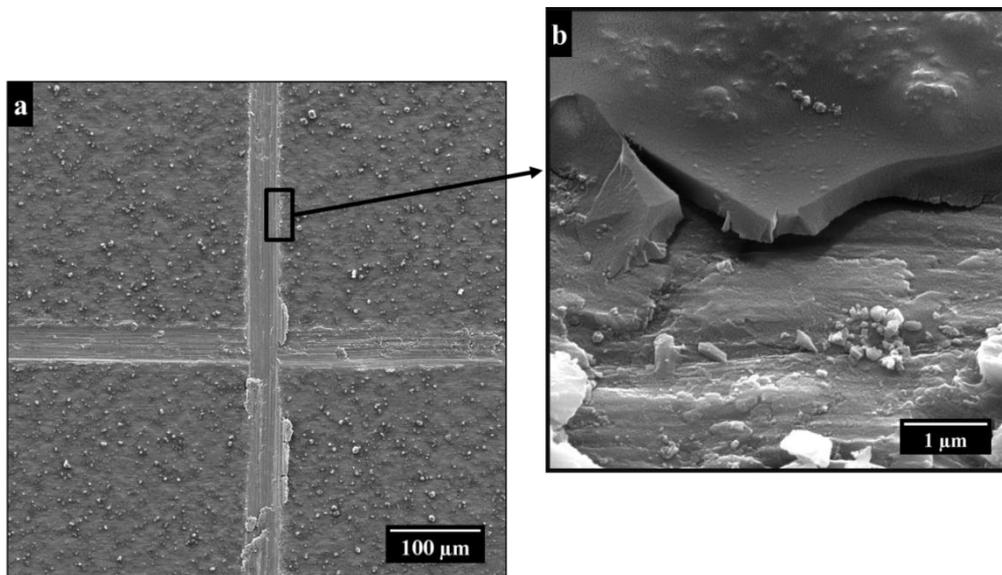
Figura 29 - Mapeamento por EDS da superfície da amostra com aplicação do filme híbrido TEOS/MTES com a adição da HA, após o ensaio de adesão.



A Figura 30(a) e a Figura 30(b) são uma ampliação da região da trilha gerada na incisão para o teste de adesão e evidenciam que o filme foi removido na região da trilha, mas manteve-se aderido ao substrato na região adjacente à trilha.

A Figura 30 (a) apresenta por MEV-FEG a morfologia do revestimento após o ensaio de adesão. Observou-se nas micrografias que após o ensaio de adesão, o filme foi arrancado na região da incisão, porém nas demais regiões em torno da trilha formada o revestimento apresentou-se aderido ao substrato Ti-cp, com a presença das partículas de HA que foram adicionadas ao revestimento TEOS/MTES. A Figura 30 (b) é uma ampliação da região da trilha gerada na incisão do ensaio e evidencia o filme na região da trilha, comprovando que mesmo após o teste de adesão, o revestimento manteve-se aderido ao substrato.

Figura 30- Micrografias obtidas por MEV-FEG do revestimento híbrido bioativo: (a) trilha após o ensaio de adesão (magnificação de 500x) e (b) ampliação do revestimento após o ensaio de adesão (magnificação de 50000x).



A Figura 31 apresenta imagens tridimensionais obtidas pela análise de AFM das superfícies das amostras Ti-Cp e Ti/N/TM/HA. Na Tabela 9 são apresentados os valores de rugosidade média obtidos pela análise de AFM e os valores médios do ângulo de contato, obtidos pelo método da gota séssil para as amostras de Ti-Cp puro e com os diferentes revestimentos.

Figura 31 - Imagens tridimensionais obtidas por AFM da superfície das amostras estudadas: (a) Ti-Cp; (b) Ti/N/TM; (c) Ti/N/TM/HA.

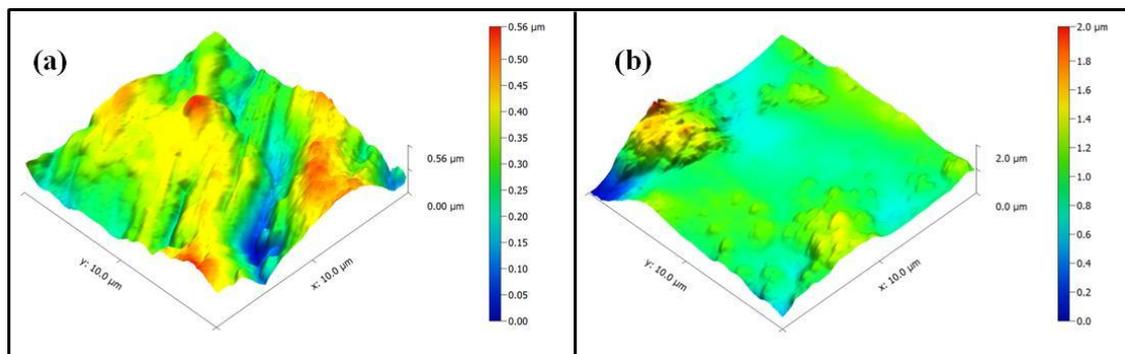


Tabela 9 - Valores de ângulo de contato superficial e os valores médios de rugosidade obtidos pela análise AFM para as amostras com aplicação do revestimento híbrido TEOS/MTES com hidroxiapatita.

Amostra	Ângulo de Contato (°)	Rugosidade (nm)	
		Ra	Rz
Ti-Cp	80 ± 1,0	13,7 ± 4,0	39,7 ± 9,0
Ti/N/TM	51 ± 1,0	6,5 ± 0,6	35,6 ± 7,0
Ti/N/TM/HA	91 ± 1,0	7 ± 1,5	67,9 ± 10

Comparando-se os valores de R_a das amostras Ti/N/TM e Ti/N/TM/HA com o valor de R_a do substrato Ti-Cp da Tabela 9 evidencia-se que o revestimento TEOS/MTES foi capaz de suavizar as ranhuras do substrato, visto que o valor de R_a diminui com a aplicação do revestimento. Porém foi possível observar que o valor de R_z da amostra Ti/N/TM/HA que correspondente à distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais profundo da superfície da amostra foi bem maior que o seu valor de R_a indicando que provavelmente pela presença dos aglomerados de HA a superfície apresentou irregularidades. Apesar disso, seus valores de espessura de camada (Tabela 6) mostraram que o revestimento nivelou a superfície do substrato.

Na Tabela 9 também é possível observar que a superfície da amostra Ti/N/TM/HA possui um caráter hidrofóbico. Comparando-se com o valor do ângulo de contato do substrato Ti-Cp foi possível observar que a superfície da amostra Ti/N/TM/HA possui menor molhabilidade, apresentando-se mais hidrofóbica. A amostra Ti/N/TM possui um comportamento hidrofílico, comparando-se com o as amostras Ti-Cp e Ti/N/TM/HA.

5.7 Caracterização biológica

5.7.1 Estudo de biocompatibilidade *in vitro*

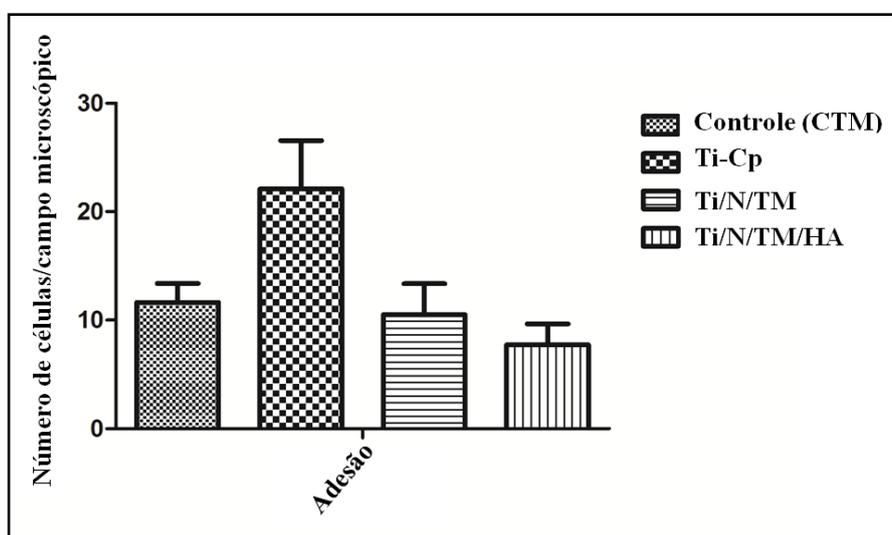
Para a verificação da adesão, viabilidade, morfologia, citotoxicidade e diferenciação celular, foram analisados 4 diferentes grupos, nomeados: (1) controle (CTM), composto de células-tronco mesenquimais aderidas em poços de cultivos; (2) titânio comercialmente puro lixado (Ti-Cp), (3) titânio comercialmente puro lixado, pré-tratado com solução de NaOH com revestimento híbridos TEOS/MTES (Ti/N/TM) e (4) titânio comercialmente puro lixado, pré-tratado com solução de NaOH com revestimento híbrido TEOS/MTES e adição de hidroxiapatita (Ti/N/TM/HA).

5.7.2 Adesão e Viabilidade Celular

A Figura 32 apresenta o gráfico de adesão celular testada nos diferentes grupos: controle (CTM), Ti-Cp, Ti/N/TM e Ti/N/TM/HA.

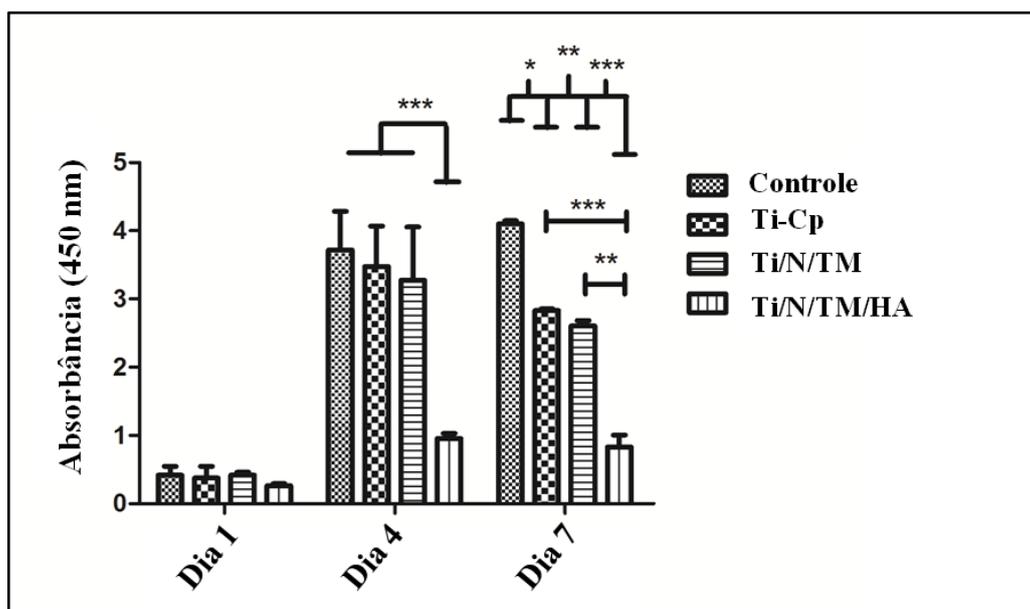
A análise estatística com *one-way* ANOVA indicou que há diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) na adesão celular para os grupos comparados, desta forma foi utilizado o teste *post hoc* Tukey (teste de comparação de médias) evidenciando que, no gráfico, o grupo Ti-Cp apresentou maiores índices de adesão celular, embora não tenham ocorrido diferença estatística significativa quando comparado aos grupos Ti/N/TM e Ti/N/TM/HA.

Figura 32 - Teste de adesão celular sobre a superfície dos grupos revestidos com a presença da hidroxiapatita (Ti/N/TM/HA), grupos revestidos (Ti/N/TM), não revestidos (Ti-Cp) e controle (CTM).



A análise de viabilidade celular foi realizada em 1, 4 e 7 dias após o processo de semeadura das células-tronco mesenquimais sobre os diferentes grupos: controle, Ti-Cp e Ti/N/TM e Ti/N/TM/HA, como observado na Figura 33.

Figura 33 - Viabilidade celular avaliada em 1, 4 e 7 dias após a semeadura celular. Os resultados são apresentados como média±erro padrão. Os asteriscos acima das barras correspondem a comparações dos diversos grupos entre si.; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.



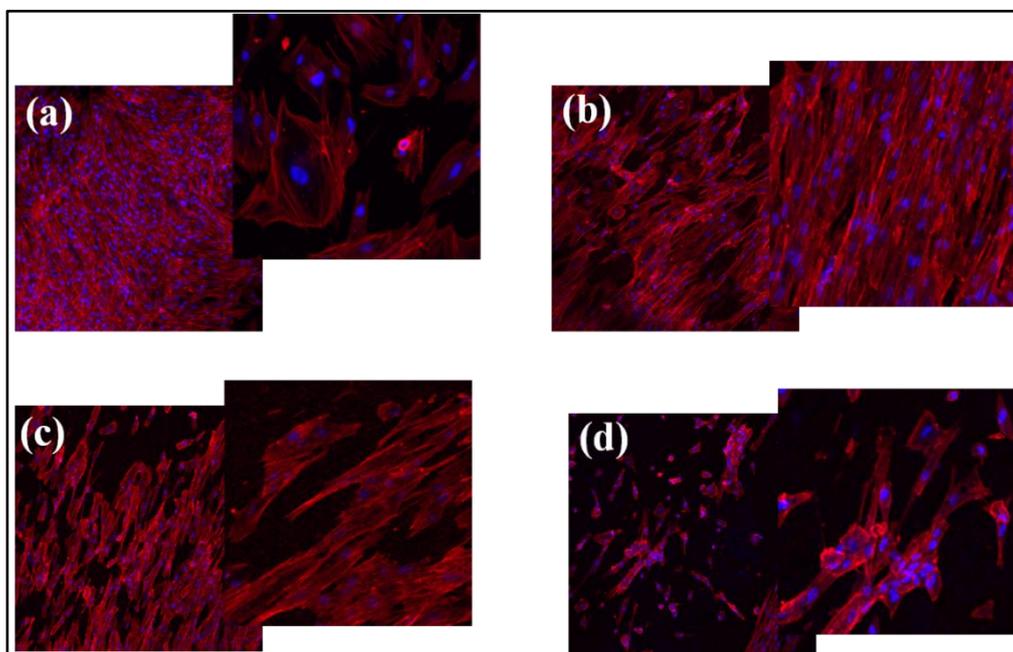
A partir do ensaio de viabilidade celular (Figura 33) pelo método de WST-8 verifica-se o metabolismo celular por meio da atividade mitocondrial. Dessa forma, quanto maior a absorbância lida no espectrofotômetro, maior a conversão do reagente pela mitocôndria, alterando a coloração da solução de amarelo claro para laranja, o que, conseqüentemente corresponde a, maior quantidade de células metabolicamente ativas presentes.

Para a análise estatística dos resultados apresentados na Figura 35, uma comparação foi realizada entre os grupos em cada dia de análise em termos de viabilidade celular. No dia 1, os diferentes grupos mostraram comportamento semelhante, não havendo diferença estatística entre os mesmos. Para o dia 4, o grupo Ti/N/TM/HA foi estatisticamente diferente ($p < 0,001$) dos grupos Ti-Cp, Ti/N/TM e controle, isso significa que a proliferação das células foi inferior no grupo Ti/N/TM/HA em comparação aos grupos Ti/N/TM e Ti-Cp, já que o mesmo mostrou possuir o menor número de células metabolicamente ativas ao longo do período de análise. No dia 7 avaliado foi possível observar que o grupo controle apresentou diferença estatística com

todos os grupos testados. Na comparação com o grupo Ti-Cp o $p < 0,05$. Com relação ao grupo Ti/N/TM o $p < 0,01$. Já quando comparado ao grupo Ti/N/TM/HA o $p < 0,001$. Ainda, não houve diferença estatística entre os grupos Ti-Cp e Ti/N/TM. Já esses grupos foram estatisticamente diferentes do grupo Ti/N/TM/ HA ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente).

A morfologia celular, apresentada na Figura 34, foi avaliada após quatro dias de semeadura das CTMs nos diferentes biomateriais e grupo controle (células semeadas diretamente no poço de cultura). Pode-se observar que nos grupos Ti-Cp (Figura 34-b) e Ti/N/TM (Figura 34-c), as células distribuíram-se mais ao longo da sua superfície e apresentaram-se mais alongadas, com formato planar, morfologia típica de células-tronco mesenquimais, demonstrando que houve melhor aderência celular quando comparado ao grupo Ti/N/TM/HA (Figura 34-d). Nesse último grupo é possível visualizar uma morfologia mais arredondada, com pontos focalizados de fluorescência, demonstrando uma adesão celular incompleta ao material.

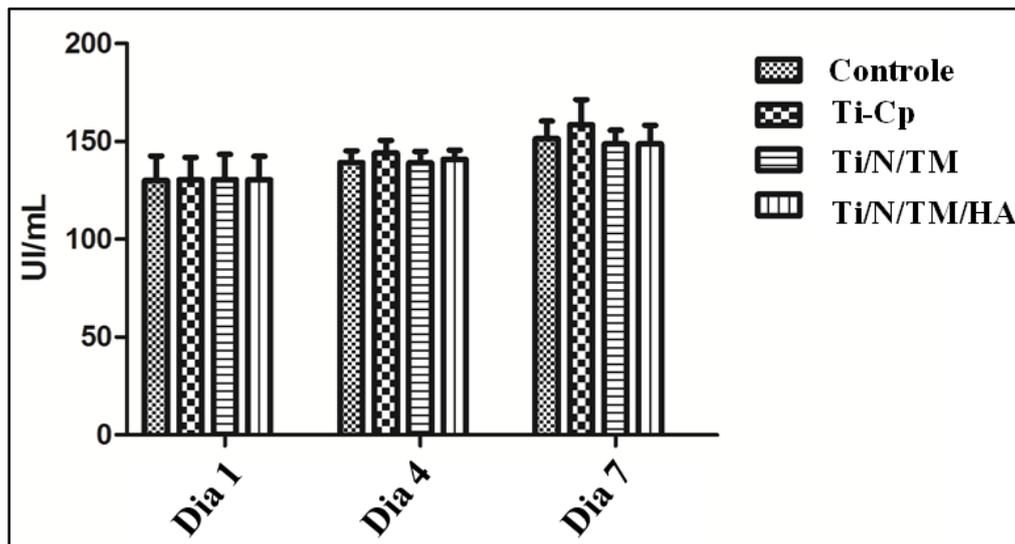
Figura 34 - Microscopia de fluorescência demonstrando a morfologia das CTMs sobre a superfície dos grupos: (a) controle; (b) Ti-Cp; (c) Ti/N/TM e (d) Ti/N/TM/HA. A magnificação das fotografias da primeira coluna é de 10x e das fotografias da segunda coluna também são de 10x, porém acrescido de zoom digital de 3x.



O teste de LDH (lactato desidrogenase), mostrado na Figura 35, foi utilizado para verificar a citotoxicidade dos revestimentos e como pode ser observado, em todos

os dias de análise, todos os grupos apresentaram-se semelhantes quanto à dosagem da enzima lactato desidrogenase, inclusive na comparação com o grupo controle, padrão-ouro para o cultivo de células.

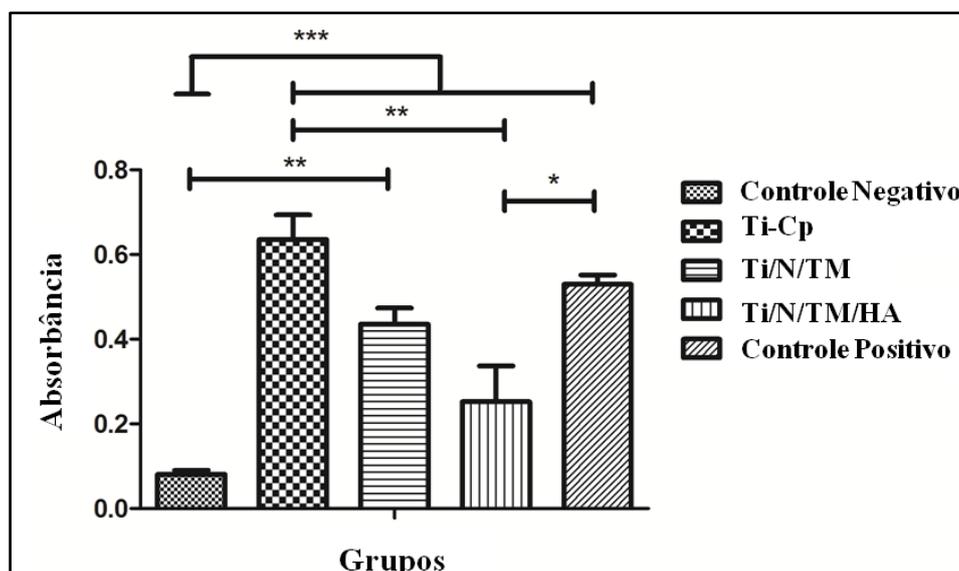
Figura 35 - Teste de toxicidade: dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das células. Os dados são apresentados como média±erro padrão.



5.7.3 Diferenciação Osteogênica

A Figura 36 apresenta o gráfico de adesão celular testada nos diferentes grupos: controle (CTM), Ti-Cp, Ti/N/TM e Ti/N/TM/HA.

Figura 36- Ensaio de diferenciação osteogênica sobre as superfícies dos grupos não revestidos (Ti-Cp), e revestidos (Ti/N/TM/HA). Os dados são apresentados como média±erro padrão.



Todos os grupos do gráfico da Figura 36, ao serem comparados com o controle negativo, células não submetidas ao procedimento de diferenciação, apresentaram diferença estatística com $p < 0,001$, a exceção do grupo Ti/N/TM, cujo $p < 0,01$. Ao serem comparados ao grupo controle positivo, cujas células foram submetidas ao protocolo de diferenciação, o único grupo de biomaterias a apresentar diferença estatística foi o grupo Ti/N/TM/HA, apresentando menor absorvância e, conseqüentemente, menos diferenciação osteogênica ($p < 0,05$). Verificou-se que os grupos Ti-Cp e Ti/N/TM apresentaram osteoindução, comparáveis ao grupo positivo, não havendo diferença estatística significativa entre estes dois grupos. Ainda, também houve diferença estatística entre o grupo Ti-Cp e o grupo Ti/N/TM/HA ($p < 0,05$). Com relação ao grupo Ti/N/TM/HA, não se observou diferenciação osteogênica, visto que quando comparado ao grupo onde somente foi analisado o grupo Ti/N/TM/HA sem células (somente no meio de cultura suplementado), a absorvância média foi semelhante.

Para que ocorra uma interação adequada entre as células e o biomaterial, faz-se necessário que o mesmo possua características semelhantes ao nicho natural das células. Dessa forma, diversas características do biomaterial, para a sua posterior aplicação *in vivo*, devem ser avaliadas. Entre as variáveis estudadas estão o tempo de degradabilidade, a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, as análises morfológicas e topográficas, a capacidade de adesão celular, a compatibilidade do biomaterial com as células e diferenciação celular.

Com relação aos ensaios biológicos, de maneira geral, foi possível verificar que a interação das células não ocorreu de maneira adequada com o biomaterial Ti/N/TM/HA.

No ensaio de adesão (Figura 32), embora não tenha havido diferença estatística, o grupo Ti/N/TM/HA mostrou a pior aderência celular, o que se refletiu, posteriormente, nos ensaios de viabilidade celular (Figura 33). Entretanto, pelos ensaios de citotoxicidade (Figura 35) não parece ter havido toxicidade por parte das células, já que os valores da enzima lactato desidrogenase foram semelhantes ao grupo controle. Também podemos observar, por meio de análises de microscopia confocal (Figura 34), que as células não conseguiram se adaptar adequadamente a esse ambiente, visto que não demonstraram o padrão de morfologia fibroblastóide esperado.

Além disso, ao observarmos o comportamento das células frente ao biomaterial de titânio, sem revestimento, fica claro que esse apresenta bons resultados com relação a

aderência e viabilidade celular, assim como níveis de LDH semelhantes ao grupo controle, padrão-ouro para cultivo de células. O mesmo verificou-se para o grupo Ti/N/TM.

Na diferenciação osteogênica (Figura 36), verificamos que houve osteoindução nos grupos Ti-Cp e Ti/N/TM, comparáveis aos níveis de diferenciação do controle positivo. Já o grupo Ti/N/TM/HA, embora tenha tido diferença estatística do grupo controle negativo, não parece ter apresentado osteoindução. Essa observação se deve à comparação dos resultados desse grupo à absorvância do mesmo tipo de biomaterial, sem células e sem indução do protocolo de diferenciação, onde foram realizados o mesmo procedimento de análise que todos os grupos foram submetidos. Ambos os grupos de Ti/N/TM/HA, com e sem células, apresentaram absorvância muito aumentada pelo fato de que o revestimento possui partículas de hidroxiapatita, formada por sais de cálcio e fosfato, que reagem com o corante utilizado para evidenciar a diferenciação osteogênica, o *alizarin red*. Dessa forma, ao comparar-se os dois grupos, não houve diferença na absorvância média, demonstrando não ter influenciado na diferenciação. Este resultado já era esperado devido aos resultados anteriores, visto que todas as análises biológicas mostraram uma pior aderência, viabilidade e morfologia das células ali semeadas, provavelmente dificultando o processo de diferenciação celular.

Sabe-se que fatores como a química, molhabilidade, rugosidade e topografia das superfícies dos implantes influenciam diretamente na adesão, viabilidade e diferenciação celular (LIU et al., 2004; CHEN; KO, 2013; AGARWAL; GARCÍA, 2015; SHARMA et al., 2016; SHIBATA et al., 2015).

De acordo com Schwartz e Boyan (1994), para que ocorra a formação de tecido ósseo na superfície do implante, é necessário que haja o recrutamento e a proliferação de células precursoras de osteoblastos, que estas células se diferenciem em osteoblastos e produzam matriz extracelular não mineralizada, que será subsequentemente calcificada. Tais eventos sofrem grande influência das propriedades da superfície dos implantes de Ti, tais como, a composição química, energia de superfície e a textura da superfície, uma combinação entre topografia e rugosidade.

Shibata et al. (2015) e Sharma et al. (2016) afirmaram que superfícies hidrofílicas são mais desejáveis do que hidrofóbicas em vista de suas melhores interações com os fluídos biológicos, células e tecidos. Goriainov et al. (2014) destacam que superfícies hidrofílicas são capazes de absorver (*in vitro*) as proteínas de maneira

mais flexível, permitindo a sua reorganização pelas células aderentes, e favorecimento da adesão e disseminação de células.

Neste trabalho se compararmos o valor do ângulo de contato da amostra Ti/N/TM/HA (91°) com a amostra Ti-Cp (80°) e a amostra Ti/N/TM (51°), percebeu-se que a Ti/N/TM/HA apresenta uma superfície ainda mais hidrófoba que o Ti-Cp e a Ti/N/TM. Este fator poderia ter contribuído para o resultado mais favorável quanto a adesão, viabilidade e diferenciação celular desse grupo em comparação ao Ti/N/TM/HA.

Wang et al. (2013) avaliaram a influência na molhabilidade e topografia de diferentes proporções de revestimentos silanos TEOS e MTES sobre aço 316L, neste caso utilizados em *stents* vasculares e os autores observaram que revestimentos na proporção molar de TEOS/MTES de 70:30, moderadamente hidrófilos e com ângulo de contato de $45,3^\circ$, foram mais eficientes para promover uma endotelização (forma de aumentar a compatibilidade com o sangue do *stent* vascular) mais rápida, proporcionando uma adesão e proliferação celular bem maior que os revestimentos na proporção molar de TEOS/MTES de 40:60 com ângulo de contato igual a $85,1^\circ$. Mesmo sem este revestimento possuir a adição de partículas de hidroxiapatita corrobora com o valor encontrado neste trabalho, que também justificam os resultados das caracterizações biológicas.

Lai et al. (2009) e Sharma et al. (2015) evidenciam que osteoblastos aderem mais a superfícies micrométricas mais rugosas do que superfícies mais lisas e exibem uma maior diferenciação celular. Porém Jayaraman et al. (2004), Zinger et al. (2004), Wennerberg e Albrektsson (2009), Hori et al. (2011), Zhang et al. (2013) e Goriainov et al. (2014), avaliaram os efeitos da topografia de superfície do titânio na osseointegração de implantes. Em suas considerações ressaltam que um grande número de estudos tem claramente demonstrado que a resposta celulares e/ou ósseas é influenciada pela topografia de superfície do titânio ao nível micrométrico, sendo esta a topografia que diz respeito a orientação das irregularidades da superfície, ou seja, sua microtextura.

Alguns autores, como Chou et al. (1995) e Jayaraman et al. (2004), avaliaram a topografia superficial de discos de titânio em relação à morfologia das células e sugeriram que nas superfícies ranhuradas as células adquiriam uma morfologia mais alongada e polarizada. Esta descoberta estaria relacionada com uma maior síntese proteica por estas células, favorecendo, conseqüentemente, a adesão, proliferação e

diferenciação celular. A morfologia celular pode estar relacionada com os achados de proliferação celular melhorados observados em culturas realizadas em discos de titânio com uma rugosidade de 0,50 μm (ranhuras e aparência regular).

Pfeiffer et al. (2003) produziram sobre um substrato composto por araldite, uma superfície com deposição de Ti pelo processo de *sputtering*, para estudar o comportamento celular dos fibroblastos gengivais humanos em uma superfície de titânio, simulando a superfície de um implante. Este substrato com superfície de Ti depositado possuía sulcos de tamanhos conhecidos e pré-determinados. Os resultados de comportamento celular indicaram que a orientação e o tamanho dos sulcos influenciam na adesão, orientação e migração das células. Outra importante conclusão do estudo é a de que os contatos celulares são formados nas paredes e até mesmo no fundo dos sulcos, e que dependendo da profundidade dos sulcos ou a altura dos picos de uma superfície, as células podem desenvolver ou não uma interação entre elas, formando assim sua proliferação.

Neste trabalho, observou-se que a topografia do Ti-Cp (Figura 15-a) mostra-se com micro ranhuras, traços e sulcos dispostos de forma organizada ao longo do eixo e que a topografia da amostra Ti/N/TM (Figura 16-d) mostrou-se regular devido a cobertura do revestimento híbrido, ambas diferentes da superfície da amostra Ti/N/TM/HA (Figura 27), que devido à presença do revestimento com os aglomerados de hidroxiapatita exibiu uma superfície desorganizada. Estes resultados indicam que a superfície do Ti/N/TM/HA pode ter contribuído nos resultados inferiores de adesão, proliferação e diferenciação celular, em comparação com as amostras Ti-Cp e Ti/N/TM.

Os valores de rugosidade média (R_a) das amostras comparadas na Tabela 9, indicaram que não houve diferença significativa entre as amostras Ti/N/TM e Ti/N/TM/HA, porém quando comparou-se o valor de R_z (significado) observa-se que a amostra com revestimento híbrido e as partículas de hidroxiapatita (Ti/N/TM/HA) possui um R_z de maior valor que o do titânio (Ti-Cp) e que da amostra com o revestimento híbrido (Ti/N/TM). Este fato pode indicar que devido à presença destes picos e vales profundos as células não conseguiram estabelecer ligação entre elas, como pôde ser visualizado na amostra Ti/N/TM/HA (Figura 34-d). Esta ligação é essencial e importante para promover o espalhamento das células sobre a superfície promovendo sua proliferação, como evidenciado as imagens de microscopia das amostras Ti-Cp (Figura 34-b) e Ti/N/TM (Figura 34-c). O somatório destes fatos explicaria assim, os

resultados celulares e a morfologia não desenvolvida nas células sobre a superfície da amostra Ti/N/TM/HA (Figura 34-d).

Além disso, um estudo mais aprofundado da suspensão/sedimentação das partículas de hidroxiapatita no sol-gel é necessária para que não ocorra a formação de aglomerados de tamanho significativo na superfície do substrato.

Baxter et al. (2002) realizaram estudo da adesão e morfologia de osteoblastos e fibroblastos sobre superfícies de fosfato de cálcio. Em seus resultados, na superfície tratada com hidroxiapatita, observou-se muito pouco espalhamento em ambos os tipos celulares e a menor medição de cobertura celular em área. Ademais, os osteoblastos não estavam intimamente associados ao substrato, com a maior parte do corpo celular encontrando-se acima da superfície. Os autores afirmam que seus resultados foram surpreendentes, uma vez que a hidroxiapatita é considerada como material biocompatível que pode acelerar as propriedades de reparo ósseo. Neste estudo, também se esperava uma superfície favorável à proliferação e diferenciação celular no grupo revestido com filme híbrido contendo hidroxiapatita, fato que não foi evidenciado nos resultados. A justificativa dos autores para esta conclusão é de que fatores como composição, energia superficial, rugosidade e topografia da superfície possuem maior influência no comportamento de adesão e morfologia celular (favorecendo ou não estes aspectos) do que simplesmente o material induzir ou não a reparação óssea, indicando que existe uma inter-relação entre estes fatores e é difícil entender qual destes afeta em maior ou menor escala a ligação celular.

Em outro estudo, realizado por Schliephake et al. (2009), foi testada a hipótese de que a adição de coberturas de fosfato de cálcio ao titânio com superfície ácido-condicionada melhorariam a regeneração óssea periimplantar. Em conclusão, os autores afirmam que não houve a confirmação da hipótese admitida, ou seja, que a cobertura com hidroxiapatita não aumentou a formação óssea periimplantar quando comparada com titânio que sofreu somente ataque ácido como caracterização de superfície. Tal resultado corrobora com os encontrados neste estudo, onde a adição de um revestimento composto de hidroxiapatita no filme híbrido TEOS/MTES na superfície de Ti-Cp não favoreceu os valores de proliferação e diferenciação celular.

As propriedades que determinam a qualidade de uma superfície de implante, tais como química, molhabilidade, rugosidade e topografia, estão inter-relacionadas e irão, em conjunto, determinar a capacidade da superfície de permitir a osseointegração (LIU

et al.,2004; CHEN; KO, 2013; AGARWAL; GARCÍA, 2015; SHARMA et al., 2016; SHIBATA et al., 2015). Fatores como alteração de pH do meio de cultura celular ou até mesmo a presença de contaminantes na superfície analisadas, tem reflexo nos resultados biológicos. Portanto, todos estes fatores e a suas somas precisam ser levadas em consideração no comportamento da adesão, viabilidade e morfologia celular na superfície de um implante. As células possuem exigências próprias, e neste trabalho a rugosidade, molhabilidade, topografia da superfície, influenciaram nos resultados de adesão, viabilidade e diferenciação celular da superfície do Ti-Cp revestido pelo filme híbrido TEOS/MTES com partículas de hidroxiapatita.

6 CONCLUSÃO

Diferentes pré-tratamentos realizados na superfície do Ti-Cp podem proporcionar melhorias na propriedade de aderência entre o revestimento híbrido e o substrato. O melhor resultado foi obtido com NaOH apresentando boa homogeneidade e adesão ao substrato de Ti-Cp em comparação com os outros pré-tratamentos estudados sendo o mais indicado, neste estudo, para aplicação do revestimento híbrido em substrato Ti-Cp.

As micrografias de MEV-FEG também demonstraram um recobrimento regular de TEOS/MTES e sem fissuras aparentes na superfície de Ti-Cp tratada com NaOH. Os termogramas de TGA mostram que o revestimento híbrido sobre o Ti-Cp apresentou excelente estabilidade térmica, visto que terá sua integridade garantida durante em todo o processo.

Com relação a adição de hidroxiapatita na formação do revestimento híbrido conclui-se que o revestimento híbrido com os precursores alcóxidos de silício TEOS/MTES e adição de partículas de hidroxiapatita apresentou boa homogeneidade e adesão ao substrato de Ti-Cp.

As micrografias de MEV-FEG demonstram que as partículas de hidroxiapatita estão encapsuladas no filme híbrido. Além disso, demonstra que o revestimento possui diferentes espessuras de camada devido a presença dos aglomerados de partículas de hidroxiapatita.

Com relação aos resultados biológicos conclui-se que apesar do revestimento híbrido com partículas de hidroxiapatita apresentar uma adesão celular semelhante ao substrato Ti-Cp, os resultados de viabilidade e diferenciação celular não se destacaram, provavelmente pelo somatório de fatores como molhabilidade, rugosidade e topografia da superfície (devido à presença de aglomerados de HA, torna a superfície desorganizada), necessitando de um estudo mais aprofundado de suspensão/sedimentação das partículas de hidroxiapatita no sol necessária para que não ocorra a formação de aglomerados de tamanho significativo na superfície do substrato, além de preparar uma superfície em que a hidroxiapatita não esteja encapsulada no revestimento híbrido, podendo esta, entrar em contato direto com as células, aprimorando assim os resultados de adesão, viabilidade e diferenciação celular.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros propõem-se:

- Estudar o melhor método de dispersão das partículas de hidroxiapatita no sol TEOS/MTES;
- Determinar a influência da adição de diferentes concentrações de hidroxiapatita na formação do revestimento híbrido TEOS/MTES.

8 TRABALHOS PUBLICADOS

Artigo completo aceito para publicação em periódico

BONIATTI, R.; BELTRAMI, L.V.R.; AGUZZOLI, C.; KUNST, S. R.; BRANDALISE, R. N.; MALFFATI, C.F.. Pretreatment effect of the pure titanium surface on hybrid coating adhesion based on tetraethoxysilane and methyltriethoxysilane. **Journal of Coatings Technology and Research**, 2018.

9 REFERÊNCIAS

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D3359**: Standard Test Methods for Measuring Adhesion by Tape Test. 2010
- AGARWAL, R.; GARCÍA, A. J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.94, p. 53-62, 2015.
- AJAMI, E.; AGUEY-ZINSOU, K. Functionalization of electropolished titanium surfaces with silane-based self-assembled monolayers and their application in drug delivery. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 385, p.258-267, 2012.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova [online]**, v.25, n.5, 2002.
- AMATO, L.E.; LÓPEZ, D.A.; GALLIANO, P.G.; CERÉT, S.M. Electrochemical characterization of sol-gel hybrid coatings in cobalt-based alloys for orthopedic implants. **Materials Letters**, v. 59, p.2026-2031, 2005.
- APARICIO, C.; RODRIGUEZ, D.; GIL, F.J. Variation of roughness and adhesion strength of deposited apatite layers on titanium dental implants, **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, p.320-324, 2011.
- AQUINO, I.P. **Caracterização da Superfície do aço-carbono ABNT 1008 revestida com organo-silanos por meio de técnicas eletroquímicas e físico-químicas**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ARCOS, D.; BOCCACCINI, A. R.; BOHNER, M.; DÍEZ-PÉREZ, A.; EPPLE, M.; GÓMEZ-BARRENA, E.; HERRERA, A.; PLANELL, J. A.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L.; VALLET-REGÍ, M. The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis. **Acta Biomaterialia**, v.10, p.1793-1805, 2014.
- ASADI, N.; NADERI, R.; SAREMI, M. Determination of optimum concentration of cloisite in an eco-friendly silane sol-gel film to improve corrosion resistance of mild steel. **Applied Clay Science**, v. 95, p. 243–251, 2014.
- ATANACIO, A. J.; LATELLA, B. A.; BARBE, C. J.; SWAIN, M. V. Mechanical properties and adhesion characteristics of hybrid sol-gel thin films. **Surface & Coatings Technology**. v. 192, p. 354 – 364, 2005.
- BALLARRE J.; LÓPEZ, D.A.; SCHREINER, W.H.; DURÁN, A.; CERÉ, S. Protective hybrid sol-gel coatings containing bioactive particles on surgical grade stainless steel: Surface characterization. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 7260–7264, 2007.
- _____; DESIMONE, P.M.; CHORRO, M.; BACA, M.; ORELLANO, J.C.; CERÉ, S.M. Bone quality around bioactive silica-based coated stainless steel implants: Analysis by Micro-Raman, XRF and XAS techniques. **Journal of Structural Biology**, v. 184, p. 164–172, 2013.

- _____; JIMENEZ-PIQUE, E.; ANGLADA, M.; PELLICE, S.A.; CAVALIERI, A.L. Mechanical characterization of nano-reinforced silica based sol-gel hybrid coatings on AISI 316L stainless steel using nanoindentation techniques. **Surface & Coatings Technology**, v. 203, p.3325-3331, 2009.
- _____; MANJUBALA I.; SCHREINER, W.H.; ORELLANO, J.C.; FRATZL, P.; CERÉ, S. Improving the osteointegration and bone-implant interface by incorporation of bioactive particles in sol-gel coatings of stainless steel implants. **Acta Biomaterialia**, v.6, p. 1601-1609, 2010.
- _____; SELTZER, R.; MENDOZA, E.; ORELLANO, J.C.; MAI, Y.; GARCÍA, C.; CERÉ, S.M. Morphologic and nanomechanical characterization of bone tissue growth around bioactive sol-gel coatings containing wollastonite particles applied on stainless steel implants. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p.545-552, 2011.
- BARBARENA-FERNÁNDEZ, A.M.; CARMONA-QUIROGA, P.M.; VARELA-BLANCO, M.T. Interactions of TEOS with cementitious materials: chemical and physical effects. **Cement & Concrete Composites**, v. 55, p. 145-152, 2015.
- BAXTER, L. C.; FRAUCHIGER, V.; TEXTOR, M.; GWYNN, I.; RICHARDS, R.G. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **Eur. Cell Mater.**, v.4, p.1-17, 2002.
- BEHNAMGHADER, A.; SALEMI, H.; AFSHAR, A.; ARDESHIR, M. Effect of alkaline-acid treatment on the biomimetic formation of calcium phosphate layers on titanium substrates: an in vitro study, **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4 p.149-56, 2008.
- BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H.; GALLAS, M. R. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química Nova** [online]. vol.32, n.7, 2009.
- BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v.44, p.215-230, 2006.
- BRAEM, A.; NEIRINCK, B.; SCHROOTEN, J.; VAN DER BIEST, O.; VLEUGELS, J. Biofunctionalization of porous titanium coatings through sol-gel impregnation with a bioactive glass-ceramic. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 2292-2298, 2012.
- BRINKER, C.; SCHERER, G. **Sol Gel Science: The Physics And Chemistry Of Sol Gel Processing** Academic Press San Diego, 1990.
- BUDDY, D. R.; HOFFMAN, A.S.; SHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. New York: Academic Press, 1996. cap. 2, p. 37-124, 1996.
- CAPIOTTO, N. **Uso do silano BTSE como protetivo contra a corrosão de laminados de aço carbono**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- CAPLAN, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, p. 341-347, 2007.

- CARVALHO, D. R.; CARVALHO, P. S. P.; MAGRO FILHO, O.; DE MELLO, J. D. B.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Characterization and in vitro cytocompatibility of an acid-etched titanium surface. **Braz Dent J**, v. 21, p. 3–11, 2010.
- CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F.; GIOVANARDI, R.; VERONESI, P. Corrosion behavior and mechanical properties of bioactive sol-gel coatings on titanium implants. **Materials Science and Engineering C**, v. 43, p.375–382, 2014.
- CHEN, J.; WANG, J.; YUAN, H. Morphology and performances of the anodic oxide films on Ti6Al4V alloy formed in alkaline-silicate electrolyte with aminopropyl silane addition under low potential, **Appl. Surf. Sci.**, v. 284, p. 900–906, 2013.
- CHEN, Q; THOUAS, G.A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering R**, v. 87, p.1-57, 2015.
- CHEN, W-C.; KO, C-L. Roughened titanium surfaces with silane and further RGD peptide modification in vitro, **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 2713-2722, 2013.
- CHILD, T.; VAN OOIJ, W.J. Application of silane technology to prevent corrosion of metals improve paint adhesion. **Coatings World**, p. 42-53, 1999.
- CHOU, L.; FIRTH, J.D.; UITTO, V-J.; BRUNETTE, D.M. Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. **Journal Cell Science**, v.108, p.1563-73, 1995.
- CHOUDHURY, P.; AGRAWAL, D.C. Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrates. **Surf. Coat. Technol.**, v. 206, p. 360–365, 2011.
- CHUG, A.; SHUKLA, S.; MAHESH, L.; JADWANI, S. Osseointegration—Molecular events at the bone-implant interface: A review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, v.25, p. 1–4, 2013.
- CORRIU, R.J.P. The Control of Nanostructured Solids: A Challenge for Molecular Chemistry. **European Journal Inorganic Chemistry**, v. 5, p. 1109-1121, 2001.
- CRIADO, M.; SOBRADOS, I.; SANZ, J. Polymerization of hybrid organic-inorganic materials from several silicon compounds followed by TGA/DTA, FTIR and NMR techniques. **Progress in Organic Coatings**, v.77, p.880–891, 2014.
- CUI, S.; LIU, Y.; FAN, M.; COOPER, A.T.; LIN, B.; LIU, X.; HAN, G.; SHEN, X. Temperature dependent microstructure of MTES modified hydrophobic silica aerogels. **Materials Letters**, v, 65, p. 606–609, 2011.
- DALMORO, V.; SANTOS, J.H.Z. DOS; AZAMBUJA, D.S. Corrosion behavior of AA2024-T3 alloy treated with phosphonate-containing TEOS. **Journal Solid State Electrochemistry**, v.16, p.403–414, 2012.
- DANQING, Z.; OOIJ, W. J. V. Corrosion protection of AA 2024 T3 by bis-[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfide in sodium chloride solution. Part 2: mechanism for corrosion protection. **Corrosion Science**, v. 45, n. 10, p. 2177-2197, 2003.

- DEFLORIAN, F.; ROSSI, S.; FEDRIZZI, L. Silane pre-treatments on copper and aluminium. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 6097–6103, 2006.
- DIENER, A.; NEBE, B.; LÜTHEN, F.; BECKER, P.; BECK, U.; NEUMANN, H. G.; RYCHLY, J. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. **Biomaterials**, v. 26, p. 383-392, 2005.
- DIMAH, M.K.; ALBEZA, F.D.; BORRÁS, V.A.; MUÑOZ, A.I. Study of the biotribocorrosion behaviour of titanium biomedical alloys in simulated body fluids by electrochemical techniques, **Wear**, v.294-295, p.409-418, 2012.
- DUBRUEL, P.; VANDERLEYDEN, E.; BERGADÀ, M.; DE PAEPE, I.; CHEN, H.; KUYPERS, S.; LUYTEN, J.; SCHROOTEN, J.; VAN HOOREBEKE, L.; SCHACHT, E. Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of Ti-surfaces. **Surface Science**, v. 600, p.2562-2571, 2006.
- EGUSA, H.; KO N.; SHIMAZU, T.; YATANI, H. Suspected association of an allergic reaction with titanium dental implants: A clinical report, **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 100, p. 344-347, 2008.
- FATHI, M.H.; HANIFI, A.; MORTAZAVI, V. Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 202, p. 536–542, 2008.
- FERRARIS, S.; VENTURELLO, A.; MIOLA, M.; COCHI, A.; RIMONDINI, L.; SPRIANO, S. Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration. **Applied Surface Science**, v. 311, p.279-291, 2014.
- FIGUEIRA, R.B.; SILVA, C.J.R.; PEREIRA, E.V. Organic–inorganic hybrid sol–gel coatings for metal corrosion protection: a review of recent progress. **Journal of Coatings Technology and Research**, v. 12, n. 1, p. 1-35, 2015.
- FU, T.; WU, X.; WU, F.; LUO, M.; DONG, B.; JI, Y. Surface modification of NiTi alloy by sol-gel derived porous TiO₂ film. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 22, p. 1661–1666, 2012.
- GABBARDO, A.D. **Influência do pH e do envelhecimento da solução precursora na deposição do revestimento a base de silano BTSE com adição de inibidor Ce(III) e estudo do envelhecimento desse revestimento aplicado sobre aço galvanizado.** Dissertação de Mestrado em Engenharia, 2014. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- GARCÍA, C.; CERÉ, S.; DURÁN, A. Bioactive coatings deposited on titanium alloys. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, p. 3488-3495, 2006.
- _____; CERÉ, S.; DURÁN, A. Bioactive coatings prepared by sol–gel on stainless steel 316L. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 348, p. 218–224, 2004.
- _____; DURÁN, A.; MORENO, R. Stability of Suspensions of Bioactive Particles Using Hybrid Organic–Inorganic Solutions as Dispersing Media. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 34, p. 211–217, 2005.

- 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**, v.54, p.397–425, 2009.
- GORIAINOV, V.; COOK, R.; LATHAM, J. M.; DUNLOP, D. G.; OREFFO, R.O.C., Bone and metal: An orthopaedic perspective on osseointegration of metals, **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 4043-4057, 2014.
- GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem Cells**, v.22, p.487-500, 2004.
- GUREVITCH, O.; KURKALLI, B.G.S.; PRIGOZHINA, T.; KASIR, J.; GAFT, A.; SLAVIN, S. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. **Stem Cells**, v. 21, p.588-97, 2003.
- HARADA, R.; TAKEMOTO, S.; KINOSHITA, H.; YOSHINARI, M.; KAWADA, E. Influence of sulfide concentration on the corrosion behavior of titanium in a simulated oral environment, **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 268-273, 2016.
- HELMUS, M. N.; TWEDEN, K.; **Materials Selection**, In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A, Vol.1, pp.27-59, 1995.
- HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of the American Society**. v. 81, p. 1705–1728, 1998.
- HORI, N.; IWASA, F.; TSUKIMURA, N.; SUGITA, Y.; UENO, T.; KOJIMA, N.; OGAWA, T. Effects of UV photofunctionalization on the nanotopography enhanced initial bioactivity of titanium. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 3679-3691, 2011.
- IJIMA, D.; YONEYAMA, T.; DOI, H.; HAMANAKA, H.; KUROSAKI, N. Wear properties of Ti and Ti–6Al–7Nb castings for dental prostheses. **Biomaterials**, v. 24, p.1519-1524, 2003.
- IJIMA, M.; TSUKADA, M.; KAMIYA, H. Effect of surface interaction of silica nanoparticles modified by silane coupling agents on viscosity of methylethylketone suspension. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 305, p. 315-323, 2007.
- INNOCENZI, P.; ABDIRASHID, M.O.; GUGLIELMI, M. Structure and properties of sol-gel coatings from methyltriethoxysilane and tetraethoxysilane. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v.3, p. 47-55, 1994.
- ISAAC, J.; GALTAYRIES, A.; KIZUKI, T.; KOKUBO, T.; BERDAL, A.; SAUTIER, J. Bioengineered titanium surfaces affect the gene-expression and phenotypic response of osteoprogenitor cells derived from mouse calvarial bones. **European Cells and Materials**, v. 20, p.178-196, 2010.
- JAYARAMAN, M.; MEYER, U.; BÜHNER, M.; JOOS, U.; WIESMANN, H.P. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. **Biomaterials**, v. 25, p.625-631, 2004.
- JOKANOVIC´, V.; VILOTIJEVIC´, M.; JOKANOVIC´, B.; JENKO, M.; ANZEL, I.; STAMENKOVIC´, D.; LAZIC, V.; RUDOLF, R. Investigations of corrosion on the surface of titanium substrate caused by combined alkaline and heat treatment. **Corrosion Science**, v. 82, 180–190, 2014.

- JOSE, N. M. e PRADO, L.A.S.A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.
- KANG, S.M.; KONG, B.; OH, E.; CHOIC, J.S.; CHOI, I.S. Osteoconductive conjugation of bone morphogenetic protein-2 onto titanium/titanium oxide surfaces coated with non-biofouling poly(poly(ethylene glycol) methacrylate). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 385–389, 2010.
- KIM, B. C., BAE, H., KNOW, II. K., LEE, E. J., PARK, J. H., KHADEMHOSEINI, A., HWANG, Y. S. Osteoblastic/Cementoblastic and Neural Differentiation of Dental Stem Cells and Their Applications to Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Tissue Engineering: Part B**, v. 18, p. 235-244, 2012.
- KREGIEL, D. Advances in biofilm control for food and beverage industry using organo-silane technology: A review. **Food Control**, v. 40, p. 32–40, 2014.
- KROS, A.; JANSEN, J.A.; HOLDER, S.J.; NOLTE, R.M.; SOMMERDIJK, N.A.J.M. Silane-based hybrids for biomedical applications. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 143–155, 2002.
- KULKARNI, M.; MAZARE, A.; SCHMUKI, P.; IGLIČ, A. Biomaterial Surface Modification Of Titanium and Titanium Alloys for Medical Applications. In: SEIFALIAN, A.; DE MEL, A.; KALASKAR, D.M. **Nomedicine**. Manchester :One Central Press, 2014. cap.5, p.111-136.
- KUNST, S.R. **Elaboração e Caracterização de Revestimentos Híbridos como Pré-tratamento para as Folhas de Flandres**. Tese de Doutorado em Engenharia de Minas, Metalurgia e de Materiais. Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalurgia e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- _____; BELTRAMI, L.V.R.; CARDOSO, H.R.P.; SANTANA, J.A.; SARMENTO, V.H.V.; MÜLLER, I.L.; MALFATTI, C.F. Characterization of Siloxane-poly(methyl methacrylate) Hybrid Films Obtained on a Tinplate Substrate Modified by the Addition of Organic and Inorganic Acids, **Materials Research**, v. 18, p. 151-163, 2015.
- _____; BELTRAMI, L.V.R.; CARDOSO, H.R.P.; VEGA, M. R.O.; MENEZES, T. L.; MALFATTI, C. F. The effects of curing temperature on bilayer and monolayer hybrid films: mechanical and electrochemical properties. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 44, p. 759-771, 2014.
- LAI, H. C.; ZHUANG, L. F.; LIU, X.; WIELAND, M.; ZHANG, Z. Y. The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v.93, p. 289-296, 2009.
- LATTHE, S.S.; IMAI, H.; GANESAN, V.; RAO, A.V. Superhydrophobic silica films by sol-gel co-precursor method. **Applied Surface Science**, v. 256, p.217–222, 2009.
- LEENA, M.; RANA, D.; WEBSTER, T.J.; RAMALINGAM, M. Accelerated synthesis of biomimetic nano hydroxyapatite using simulated body fluid. **Materials Chemistry and Physics**, v.180, p.166-172, 2016.

- LE GUÉHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, v. 23, p. 844-854, 2007.
- LE GUILLOU-BUFFELLO, D.; BAREILLE, R.; GINDRE, M.; SEWING, A.; LAUGIER, P.; AMEDEE, J. Additive effect of RGD coating to functionalized titanium surfaces on human osteoprogenitor cell adhesion and spreading. **Tissue Eng. Part A**, v.14, p.1445–55, 2008.
- LEYENS, C.; PETERS, M. **Titanium and Titanium Alloys: Fundamentals and Applications**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.
- LIU, X.; CHU, P.K.; DINGA, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering R**, v. 47, p. 49–121, 2004.
- MC MURRAY R. J. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. **Nat. Mater.**, v. 518, p. 637–644, 2011.
- MEDEIROS, C. B. S.; SOUSA, I A.; NETO, A. B. N.; NAGEM, D. A. P.; ALVES, C. J; GUERRA, C. L. B. N. Caracterização de superfícies de titânio tratadas por plasma DBD. In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012, Natal.
- MEIRELLES, L. D.S. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 2204–2213, 2006.
- MOHSENI, E.; ZALNEZHAD, E.; A.R. BUSHROA, A.R. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti–6Al–4V implant: A review paper. **International Journal of Adhesion & Adhesives**, v. 48, p.238–257, 2014-a.
- MOHSENI, M.; BASTANI,S.; JANNESARI, A. Influence of silane structure on curing behavior and surface properties of sol–gel based UV-curable organic–inorganic hybrid coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 77, p. 1191–1199, 2014-b.
- MOTTE, C.; POELMAN, M.; ROOBROECK, A.; FEDEL, M.; DEFLORIAN, F.; OLIVIER, M.-G. Improvement of corrosion protection offered to galvanized steel by incorporation of lanthanide modified nanoclays in silane layer. **Progress in Organic Coatings**, v. 74, p. 326–333, 2012.
- NAVARRETE-OLIVARES, R.; HYZY, S. L.; HUTTON, D. L.; ERDMAN, C.; WIELAND, M.; BOYAN, D. B.; SCHWARTZ, Z. Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. **Biomaterials**, v. 31, p. 2728-2735, 2010.
- NIINOMI, M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. **Materials Science and Engineering: A**, v. 243, p. 231-236, 1998.
- NISHINO, Y.; EBISAWA, K.; YAMADA, Y.; OKABE, K.; KAMEI, Y.; UEDA, M. Human deciduous teeth dental pulp cells with basic fibroblast growth factor enhance wound healing of skin defect. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 22, p. 438-442, 2011.

- OCARINO, N.DE M. **Células-tronco Mesenquimais: diferenciação osteogênica in vitro estimulada pela atividade física in vivo com e sem bloqueio da óxido nítrico sintase e sua aplicação no tratamento local da osteoporose de ratas.** Tese de Doutorado em Ciência Animal. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.
- OLMSTED-DAVIS,E.A.; GUGALA,Z.; CAMARGO, F.; GANNON, F.H.; JACKSON, K.; KIENSTRA, K.A.; SHINE, H.D.; LINDSEY, R.W.; HIRSCHI, K.K.; GOODELL, M.A.; BRENNER, M.K.; DAVIS, A.R. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 100, p.15877-15882, 2003.
- OMAR, S.; REPP, F.; DESIMONE, P.M.; WEINKAMER, R.; SILVIA CERÉ, S.; BALLARRE, J. Sol-gel hybrid coatings with strontium-doped 45S5 glass particles for enhancing the performance of stainless steel implants: Electrochemical, bioactive and in vivo response. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 425, p.1-10, 2015.
- ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.d.M.; MANSUR, H.S. **Biomaterias: Fundamentos e Aplicações**, Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- OWENS, G. J.; SINGH, R. K.; FOROUTAN, F.; ALQAYSI, M.; HAN, C. M.; MAHAPATRA, C.; KIM, H.; KNOWLES, J. C. Sol-gel based materials for biomedical applications, **Progress in Materials Science**, v. 77, p. 1-79, 2016.
- PARK, J. H.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; BAIER, R.E.; MEYER, A.E.; TANNENBAUM, R.; BOYAN, B.D.; SCHWARTZ, Z. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1966-1975, 2012.
- PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, henotype, and differentiation potential. **Cell. Biol.**, v.33, p.6-25, 2006.
- PFEIFFER, F.; HERZOG, B.; KERN, D.; SCHEIDELER, L.; GERSTORFERC, J.G.; WOLBURGA, H. Cell reactions to microstructured implant surfaces. **Microelectronic Engineering**, v. 67-68, p.913-922, 2003.
- PONSONNET, L.; REYBIER, K.; JAFFREZIC, N.; COMTE, V.; LAGNEAU, C.; LISSAC, M.; MARTELET, C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. **Materials Science and Engineering: C**, v. 23, p. 551-560, 2003.
- PRASAD, S.; EHRENSBERGER, M.; GIBSON, M. P.; KIM, H.; MONACO JR. E. A., Biomaterial properties of titanium in dentistry, **Journal of Oral Biosciences**, v. 57, p.192-199,2015.
- PRESNELL, S.C.; PETERSEN, B.; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. **Cell Dev. Biol.**, v. 13, p.369-76, 2002.
- RAKMAE, S.; RUKSAKULPIWAT, Y.; SUTAPUN, W.; SUPPAKARN, N. Effect of silane coupling agent treated bovine bone based carbonated hydroxyapatite on in vitro degradation behavior and bioactivity of PLA composites, **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, p. 1428-1436, 2012.

- RODRÍGUEZ-CANO, A.; CINTAS, P.; FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M.; PACHA-OLIVENZA, M.; CRESPO, L.; SALDAÑA, L.; VILABOIA, N.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M.; BABIANO, R. Controlled silanization–amination reactions on the Ti6Al4V surface for biomedical applications. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 106, p. 248–257, 2013.
- ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, v. 21, p. 105-110, 2003.
- SAKAI, R. T.; DA CRUZ, F. M. D. L.; DE MELO, H. G.; BENEDETTI, A. V.; SANTILLI, C. V.; SUEGAMA, P. H. Electrochemical study of teos, teos/mpts, mpts/mma and teos/mpts/mma films on tin coated steel in 3.5% nacl solution. **Progress in Organic Coatings**, v. 74, n. 2, p. 288-301, 2012.
- SCHERER, G.W. Aging and drying of gels. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 100, n.1-3, p. 77-92, 1998.
- SCHLEIPHAKE, H.; AREF, A.; SCHARNWEBER, D.; RÖBLER, S.; SEWING, A. Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces on periimplant bone formation. Part II: Calcium phosphate coatings. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 20, p. 38-44, 2009.
- SCHWARTZ, Z. & BOYAN, B.D. Underlying mechanisms at the bonebiomaterial interface. **J. Cell Biochem.**, v.56, n.3, p.340-347, 1994.
- SCOPUS, 2016. Disponível em: <<https://www.scopus.com>>. Acesso em: 10 nov. 2016.
- SHARMA, S.; BANO, S.; GHOSH, A. S.; MANDAL, M.; KIM, H.; DEY, T.; KUNDU, S. C. Silk fibroin nanoparticles support in vitro sustained antibiotic release and osteogenesis on titanium surface, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, p. 1193-1204, 2016.
- SHIBATA, Y.; TANIMOTO, Y. A review of improved fixation methods for dental implants. Part I: Surface optimization for rapid osseointegration, **Journal of Prosthodontic Research**, v. 59, p. 20-33, 2015.
- SIDANE, D.; CHICOT, D.;YALA, S.; ZIANI, S.; KHIREDDINE, H.; IOST, A.; DECOOPMAN, X. Study of the mechanical behavior and corrosion resistance of hydroxyapatite sol–gel thin coatings on 316 L stainless steel pre-coated with titania film, **Thin Solid Films**, v.593, p.71–80, 2015.
- SITTIG, C.; HÄHNER, G.; MARTI, A.; TEXTOR, M.; SPENCER, N.D.; HAUERT, R. The Implant Material, Ti6Al7Nb: surface microstructure, composition and properties, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.10, p.191-198, 1999.
- SOBIESZCZYK, S. Surface modifications of Ti and its alloys. **Advances in Materials Science**, v. 10, p.29-42, 2010.
- SOUZA, G.B.D.; LEPIENSKI, C.M.; FOERSTER, C.E.; KUROMOTO, N.K.; SOARES, P.; PONTE, H.D.A. Nanochemical and nanotribological properties of bioactive titanium surfaces prepared by alkali treatment. **Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials**, v.4, p. 756-765, 2010.

- SUBRAMARIAN, V. **Silane coupling agents for corrosion protection**, Dissertation – Doctor of Philosophy, Department of materials Science and Engineering – University of Cincinnati, Ohio, 1999.
- STEFFENS, D.; MATHOR, M.B.; SANTI, B.TS., LUCO, D.P.; PRANKE, P. Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute. **Regenerative Medicine**, v.10, p. 975-87, 2015.
- TAKEUCHI, S. M. M. T. **Revestimentos anticorrosivos à base de silanos sobre a liga de alumínio 2024-T3**. 2009. 174 f. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- TAN, G.; ZHOU, L.; NING, C.; TAN, Y.; NI, G.; LIAO, J.; YU, P.; CHEN, X. Biomimetically-mineralized composite coatings on titanium functionalized with gelatin methacrylate hydrogels. **Applied Surface Science**, v. 279, p.293-299, 2013.
- TENGVALL, P.; LUNDSTRÖM, I. Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. **Clinical Materials**, v. 9, p. 115-134, 1992.
- TIAB, D.; DONALDSON, E. C. **Chapter 6 - Wettability**, Petrophysics (Fourth Edition), Gulf Professional Publishing, Boston, p. 319-357, 2016.
- TIAN, Z.; SHI, H.; LIU, F.; XU, S.; HAN, E-H. Inhibiting effect of 8-hydroxyquinoline on the corrosion of silane-based sol-gel coatings on AA 2024-T3. **Progress in Organic Coatings**, v. 82, p. 81–90, 2015.
- TROMMER, R.M.; SANTOS, L.A.; BERGMANN C.P. Alternative technique for hydroxyapatite coatings. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, p.9587–9593, 2007.
- VALLET-REGI, M. Introduction to the world of biomaterials. **Anales de Química: International edition**, v. 93, p. S6 – S14, 1997.
- VAN OOIJ, W. J.; ZHU, D. Q.; STACY, M.; SETH, A.; MUGADA, T.; GANDHI, J.; PUOMI, P. Corrosion protection properties of organofunctional silanes: an overview. **Tsinghua Science and Technology**, v. 10, p. 639-664, 2005.
- VAN OOIJ, W.J.; CHILD, T.F. Protecting metals with silanes coupling agents. **Chemtech**, p. 26-35, 1998.
- VOJTĚCH, D.; VODĚROVÁ, M.; FOJT, J.; NOVÁK, P.; KUBÁSEK, T. Surface structure and corrosion resistance of short-time heat-treated NiTi shape memory alloy. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 1573–1582, 2010.
- WANG, D.; BIERWAGEN, G.P. Sol-gel coatings on metals for corrosion protection. **Progress in Organic Coatings**, v. 64, p.327–338, 2009.
- WANG, M.; WANG, Y.; CHEN, Y.; GU, H. Improving endothelialization on 316L stainless steel through wettability controllable coating by sol-gel technology. **Applied Surface Science**, v. 268, p.73– 78, 2013.
- WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Impl Res**, v. 20, p. 172-184, 2009.

- WIELAND, M.; CHEHROUDI, B.; TEXTOR, M.; BRUNETTE, D.M. Use of Ti-coated replicas to investigate the effects on fibroblast shape of surfaces with varying roughness and constant chemical composition. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 60, p. 434–444, 2002.
- XUE, D.; VAN OOIJ, W.J. Corrosion performance improvement of hot-dipped galvanized (hdg) steels by electro-deposition of epoxy-resin-ester modified bis-[tri-ethoxy-silyl] ethane (btse) coatings, **Progress in Organic Coatings**, v. 76, p. 1095-1102, 2013.
- YANG, J.; CHEN, J.; SONG, J. Studies of the surface wettability and hydrothermal stability of methyl-modified silica films by ft-ir and raman spectra, **Vibrational Spectroscopy**, v. 50, p. 178-184, 2009.
- YANG, Y.; TIAN, J.; DENG, L.; ONG, J. L. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. **Biomaterials**, v. 23, p. 1383–9, 2002.
- YOUNG, H. E.; STEELE, T. A.; BRAY, R.A. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomical Record**, v. 264, p. 51-62, 2001.
- YU, H.; LIANG, X.; WANG, J.; WANG, M.; YANG, S. Preparation and characterization of hydrophobic silica aerogel sphere products by co-precursor method. **Solid State Sciences**, v.48, p. 155-162, 2015.
- ZAND, B. N.; MAHDAVIAN, M. Corrosion and adhesion study of polyurethane coating on silane pretreated aluminum. **Surface & Coatings Technology**, v. 203, p. 1677 – 1681, 2009.
- ZAVAN, B.; BRESSAN, E.; SIVOLELLA, S.; BRUNELLO, G.; CHIARA, G.; FERRARESE, N.; FERRONI, L.; STELLINI, E. Dental Pulp Stem Cells and Tissue Engineering Strategies for Clinical Application on Odontoiatric Field. **Biomaterials Science and Engineering**, 2011.
- ZHANG, W.; LI, Z.; HUANG, Q.; XU, L.; LI, J.; JIN, Y.; WANG, G.; LIU, X.; JIANG, X. Effects of a hybrid micro/nanorod topography-modified titanium implant on adhesion and osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p. 257-265, 2013.
- ZHELUDKEVICH, M. L.; SALVADO I. M.; FERREIRA, M. G. S. Sol–gel coatings for corrosion protection of metals. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, p. 5099 – 5111, 2005.
- ZHENG, Q.; SHIMIZU, T.; SHIRATORI, T.; YANG, M. Tensile properties and constitutive model of ultrathin pure titanium foils at elevated temperatures in microforming assisted by resistance heating method. **Materials and Design**, v. 63, p.389-397, 2014.
- ZHOU, T.; ZHU, Y.; LI, X.; LIU, X.; YEUNG, W.K.K.; WU, S.; WANG, X.; CUI, Z.; YANG, X.; CHU, K.P. Surface Functionalization of Biomaterials by Radical Polymerization. **Prog. Mater. Sci.**, v. 83, p.191–235, 2016.
- ZHU, D. **Corrosion Protection of Metals by Silane Surface Treatment, PhD**, Engineering : Materials Science. University of Cincinnati. Cincinnati, 2005.

- ZHU, X.; CHEN, J.; SCHEIDELER, L.; REICHL, R.; GEIS-GERSTORFER, J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. **Biomaterials**, v. 25, p. 4087-4103, 2004.
- ZINGER, O.; ANSELME, K.; DENZER, A.; HABERSETZER, P.; WIELAND, M.; JEANFILS, J.; HARDOUIN, P.; LANDOLT, D. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography, **Biomaterials**, v. 25, p. 2695-2711, 2004.
- ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279-4295, 2002.

ANEXO 1

Name and formula

Reference code:	00-009-0432
Mineral name:	Hydroxylapatite, syn
PDF index name:	Calcium Phosphate Hydroxide
Empirical formula:	Ca ₅ HO ₁₃ P ₃
Chemical formula:	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)

Crystallographic parameters

Crystal system:	Hexagonal
Space group:	P63/m
Space group number:	176
a (Å):	9,4180
b (Å):	9,4180
c (Å):	6,8840
Alpha (°):	90,0000
Beta (°):	90,0000
Gamma (°):	120,0000
Calculated density (g/cm ³):	3,16
Measured density (g/cm ³):	3,08
Volume of cell (10 ⁶ pm ³):	528,80
Z:	2,00

RIR: -

Subfiles and Quality

Subfiles:	Inorganic Mineral Common Phase Pharmaceutical
Quality:	Indexed (I)

Comments

Color:	Green, bluish green, yellow-green, grayish green, violet, violet-blue, violet, colorless, light greenish white, gray, brown, pinkish red, pinkish-red, blue
General comments:	I/I ₁ are peak values from a pattern which shows slight broadening of prism reflections. Validated by calculated data 00-024-0033.
Sample source:	Sample obtained following the procedure indicated by Hodge et al., <i>Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.</i> , 10 156 (1938).
Optical data:	B=1.651, Q=1.644, Sign=-
Additional pattern:	See ICSD 22059 (PDF 01-073-0293); ICSD 22060 (PDF 01-073-0294); ICSD 24240 (PDF 01-073-1731); ICSD 26204 (PDF 01-074-0565); ICSD 26205 (PDF 01-074-566); ICSD 34457 (PDF 01-076-0694) and ICSD 203027 (PDF 01-084-1998). To replace 34-10.

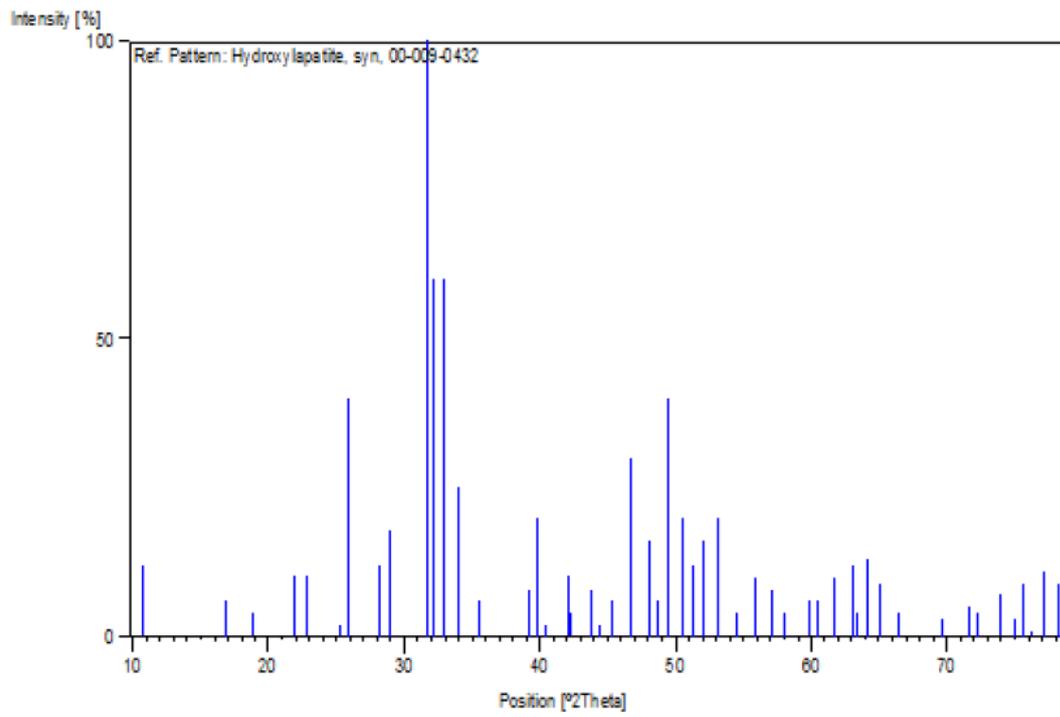
References

Primary reference:	de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands., <i>ICDD Grant-in-Aid</i>
--------------------	---

Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	1	0	0	8,17000	10,820	12,0
2	1	0	1	5,26000	16,842	6,0
3	1	1	0	4,72000	18,785	4,0
4	2	0	0	4,07000	21,820	10,0
5	1	1	1	3,88000	22,902	10,0
6	2	0	1	3,51000	25,354	2,0
7	0	0	2	3,44000	25,879	40,0
8	1	0	2	3,17000	28,127	12,0
9	2	1	0	3,08000	28,967	18,0
10	2	1	1	2,81400	31,774	100,0
11	1	1	2	2,77800	32,197	60,0
12	3	0	0	2,72000	32,902	60,0
13	2	0	2	2,63100	34,049	25,0
14	3	0	1	2,52800	35,481	6,0
15	2	1	2	2,29600	39,205	8,0
16	3	1	0	2,26200	39,819	20,0
17	2	2	1	2,22800	40,453	2,0
18	3	1	1	2,14800	42,030	10,0
19	3	0	2	2,13400	42,319	4,0
20	1	1	3	2,06500	43,805	8,0
21	4	0	0	2,04000	44,370	2,0
22	2	0	3	2,00000	45,306	6,0
23	2	2	2	1,94300	46,713	30,0
24	3	1	2	1,89000	48,104	16,0
25	3	2	0	1,87100	48,624	6,0
26	2	1	3	1,84100	49,469	40,0
27	3	2	1	1,80600	50,494	20,0
28	4	1	0	1,78000	51,285	12,0
29	4	0	2	1,75400	52,102	16,0
30	0	0	4	1,72200	53,145	20,0
31	1	0	4	1,68400	54,442	4,0
32	3	2	2	1,64400	55,881	10,0
33	3	1	3	1,61100	57,129	8,0
34	5	0	1	1,58700	58,075	4,0
35	4	2	0	1,54200	59,940	6,0
36	3	3	1	1,53000	60,459	6,0
37	2	1	4	1,50300	61,662	10,0
38	5	0	2	1,47400	63,013	12,0
39	5	1	0	1,46500	63,445	4,0
40	3	0	4	1,45200	64,080	13,0
41	5	1	1	1,43300	65,033	9,0
42	4	2	2	1,40700	66,388	4,0
43	5	1	2	1,34800	69,701	3,0
44	4	3	1	1,31600	71,653	5,0
45	5	2	0	1,30600	72,288	4,0
46	4	2	3	1,28000	73,997	7,0
47	3	2	4	1,26500	75,025	3,0
48	2	1	5	1,25700	75,586	9,0
49	4	3	2	1,24900	76,156	1,0
50	5	1	3	1,23500	77,177	11,0
51	5	2	2	1,22100	78,230	9,0

Stick Pattern



ANEXO 2

Name and formula

Reference code: 01-086-1585
Common name: Tricalcium phosphate(V)
ICSD name: Calcium Phosphate
Empirical formula: $\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$
Chemical formula: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Crystallographic parameters

Crystal system: Rhombohedral
Space group: R-3m
Space group number: 166

a (Å): 5,2479
b (Å): 5,2479
c (Å): 18,6910
Alpha (°): 90,0000
Beta (°): 90,0000
Gamma (°): 120,0000

Calculated density (g/cm³): 3,46
Measured density (g/cm³): 3,49
Volume of cell (10⁶ pm³): 445,79
Z: 3,00

RIR: 2,14

Subfiles and Quality

Subfiles: Inorganic
ICSD Pattern
Quality: Calculated (C)

Comments

Additional pattern: See PDF 00-032-0176.
ICSD collection code: 200202

References

Primary reference: *Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)*
Structure: Roux, P., Louer, D., Bonel, G., *C. R. Seances Acad. Sci., Ser. C*, 286, 549, (1978)

Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1	0	0	3	6,23033	14,204	0,4
2	1	0	1	4,41614	20,091	1,5
3	0	1	2	4,08714	21,727	0,6
4	1	0	4	3,25796	27,353	0,7
5	0	0	6	3,11517	28,632	3,7
6	0	1	5	2,88706	30,949	87,6

7	1	1	0	2,62395	34,143	100,0
8	1	1	3	2,41823	37,149	4,6
9	1	0	7	2,30221	39,095	0,5
10	0	2	1	2,25580	39,934	0,3
11	2	0	2	2,20807	40,835	20,5
12	0	1	8	2,07678	43,544	10,9
13	0	2	4	2,04357	44,288	11,7
14	1	1	6	2,00688	45,142	5,8
15	2	0	5	1,94178	46,744	42,8
16	0	2	7	1,72862	52,925	25,1
17	1	2	2	1,68947	54,251	0,1
18	2	0	8	1,62844	56,462	1,4
19	2	1	4	1,61229	57,079	0,1
20	0	1	11	1,59158	57,892	0,1
21	1	2	5	1,56087	59,143	18,2
22	0	0	12	1,55758	59,280	9,8
23	3	0	0	1,51494	61,124	12,4
24	3	0	3	1,47205	63,106	0,4
25	2	1	7	1,44353	64,501	7,0
26	1	2	8	1,38397	67,640	0,7
27	1	0	13	1,37081	68,379	0,1
28	0	3	6	1,36082	68,951	2,5
29	1	1	12	1,33938	70,216	0,1
30	2	2	0	1,31197	71,908	14,7
31	2	2	3	1,28382	73,741	0,1
32	0	1	14	1,28095	73,933	0,2
33	2	1	10	1,26477	75,041	13,7
34	0	0	15	1,24607	76,367	0,8
35	0	3	9	1,22391	78,008	0,2
36	0	2	13	1,21500	78,690	0,6
37	2	2	6	1,20912	79,148	0,5
38	3	1	5	1,19443	80,318	7,0
39	2	0	14	1,15111	84,008	0,1
40	1	3	7	1,13987	85,029	0,1
41	1	0	16	1,13141	85,817	0,1
42	0	4	2	1,12790	86,149	1,0
43	1	1	15	1,12560	86,368	9,2
44	3	1	8	1,10918	87,971	1,8
45	4	0	4	1,10403	88,488	0,4
46	2	1	13	1,10254	88,639	0,1

Stick Pattern

