

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E ENGENHARIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE

PROCESSOS E TECNOLOGIAS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES PROTETIVOS E
BIOATIVOS APLICADOS SOBRE LIGA DE TITÂNIO COM POTENCIAL
APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

PATRÍCIA MARCOLIN

Caxias do Sul, 2018

Patrícia Marcolin

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES PROTETIVOS E
BIOATIVOS APLICADOS SOBRE LIGA DE TITÂNIO COM POTENCIAL
APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos, orientado pela Prof^ª. Dr^ª. Rosmary Nichele Brandalise e coorientado pela Prof^ª. Dr^ª. María Cristina Moré Farias.

Caxias do Sul, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M321o Marcolin, Patrícia

Obtenção e caracterização de filmes protetivos e bioativos aplicados sobre liga de titânio com potencial aplicação como biomaterial / Patrícia Marcolin. – 2018.

103 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2018.

Orientação: Rosmary Nichele Brandalise.

Coorientação: Maria Cristina Moré Farias.

1. Materiais biomédicos. 2. Biodegradação. 3. Ligas de titânio. 4. Filmes Finos. 5. Silano. I. Brandalise, Rosmary Nichele, orient. II. Farias, Maria Cristina Moré, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 616-7

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES PROTETIVOS E BIOATIVOS APLICADOS SOBRE LIGA DE TITÂNIO COM POTENCIAL APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL

Patricia Marcolin

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais

Caxias do Sul, 28 de setembro de 2018

Orientadores:

Profa. Dra. Rosmary Nichele Brandalise
Orientadora
Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Maria Cristina More Farias
Coorientadora
Universidade de Caxias do Sul

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Fassini Michels
Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Lúcia Vieira
Universidade do Vale do Paraíba

Profa. Dra. Venina dos Santos
Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus pela força, coragem e inspiração, e por tornar tudo isso possível.

Agradeço aos meus pais, por toda a dedicação, companheirismo, carinho e amor, ou melhor, por tudo que fizeram por mim em toda a minha vida.

Ao meu marido, Elton J. B. de Oliveira, pela paciência, dedicação e incentivo.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª Rosmary Nichele Brandalise, pela orientação e acompanhamento indispensável na realização deste trabalho.

A minha coorientadora Prof^ª. Dr^ª María Cristina Moré Farias, pela exemplar orientação, dedicação e acompanhamento indispensável na realização deste trabalho.

Ao Laboratório Genômica, Proteômica e Reparo de DNA, em especial a Dr^ª. Caroline Frozza e a Prof^ª. Dr^ª. Mariana Roesch Ely, por todo apoio, orientação e dedicação na realização deste estudo.

Ao Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em especial ao Murilo Camuri Crovace, pela confiança e apoio na realização deste estudo.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em especial a Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Vieira pelo apoio, orientação e dedicação na realização deste estudo.

A graduanda em Engenharia Civil e bolsista de Iniciação Científica, Tatiane L. Scopel, pelo apoio e dedicação na realização de todas as etapas e ensaios deste estudo.

Ao Laboratório de Química (LQUI), em especial a Sonia Blankendurg, pelo apoio, palavras de incentivo e motivação.

Aos amigos(as) pelo apoio e ajuda na realização deste estudo.

Aos professores agradeço pela paciência e conhecimentos transmitidos durante todo o mestrado.

Aos colegas de laboratório por toda a colaboração e ajuda.

À Universidade de Caxias do Sul.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

EPIGRAFE

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.
(Isaac Newton)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	BIOMATERIAIS	18
3.1.1	Biomateriais metálicos	20
3.1.2	Liga de Ti-6Al-4V	22
3.2	CORROSÃO DA LIGA LTI-6AL-4V	23
3.3	REVESTIMENTOS DE BIOMATERIAIS	26
3.3.1	Revestimentos obtidos pelo processo sol-gel	27
3.3.1.1	Precusores de Silício	31
3.3.2	Pré-tratamentos e seus efeitos na adesão de filmes e na viabilidade celular	32
3.4	REVESTIMENTOS HÍBRIDOS E BIOATIVOS	35
3.4.1	Biovidro	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	MATERIAIS	38
4.2	MÉTODOS	41
4.2.1	Preparação dos substratos - Etapa 1	42
4.2.2	Preparação e aplicação dos filmes - Etapa 2	42
4.2.3	Ensaio de caracterização - Etapa 3	44
4.2.3.1	Caracterização das partículas de Biovidro F18 e dos filmes	44
4.2.3.2	Caracterização dos substratos e dos sistemas substratos-filme	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS BIOVIDRO F18 E DOS FILMES	50
5.1.1	Composição química das partículas de Biovidro F18	50
5.1.2	Propriedades térmicas dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18	51
5.1.3	Caracterização da estrutural dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18	53
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E DOS SISTEMAS SUBSTRATO-FILME	55
5.2.1	Morfologia das superfícies - substratos e sistemas substrato-filme	55
5.2.2	Topografia das superfícies - substratos e sistemas substrato-filme	57
5.2.3	Espessura dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 depositados sobre o substrato metálico lixado e não lixado	59

5.2.4	Aderência dos filmes aos substratos.....	61
5.2.5	Ângulo de contato - substratos e sistemas substrato-filme.....	63
5.2.6	Resistência à corrosão - substratos e sistemas substrato-filme.....	66
5.2.7	Análise biológica - substratos com e sem lixamento e sistemas substrato-filme.....	68
5.2.7.1	Morfologia celular.....	68
5.2.7.2	Viabilidade celular.....	78
5.2.7.3	Citotoxicidade.....	82
6	CONCLUSÃO.....	88
7	TRABALHOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS.....	90
7.1	ARTIGO COMPLETO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO.....	90
7.2	TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO.....	90
8	APÊNDICE.....	91
	REFERÊNCIAS.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades mecânicas requeridas à liga Ti-6Al-4V	23
Tabela 2. Composição química da liga Ti-6Al-4V fornecida pela empresa Ti-Brasil Ltda.....	38
Tabela 3. Informações técnicas dos reagentes utilizados.	40
Tabela 4. Reagentes e suas quantidades necessárias para preparação de 1 L de SBF.	40
Tabela 5. Bandas características dos comprimentos de onda pela análise de FTIR.	53
Tabela 6. Parâmetros de rugosidade do ensaio de AFM para todas as condições estudadas.	57
Tabela 7. Medidas de espessura para os sistemas substrato-filme MAP/TEOS e substrato-filme MAP/TEOS/F18.....	60
Tabela 8. Comparação da viabilidade celular de todas as condições testadas.	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Codificação e descrição das amostras do estudo.	39
Quadro 2. Critérios de avaliação da aderência para os sistemas substrato-filme. Adaptado de ASTM D3359-09 (2010).....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da interação eletroquímica entre a interface do metal e a solução aquosa. Adaptado de Stansbury; Buchanan (2000).....	26
Figura 2. Estrutura química: (a) monossilano e (b) bisilano.....	28
Figura 3. Etapas do processo de formação do filme organossilano a partir de precursores alcóxidos pelo método sol-gel: (a) hidrólise de um organossilano; (b) condensação do sol-gel sobre o substrato; (c) formação da rede polimérica a partir das ligações de hidrogênio. Adaptado de Kregiel, 2014.	30
Figura 4. Esquema ilustrativo da técnica de dip-coating. Adaptado de Kunst, <i>et al.</i> , 2014.	31
Figura 5. Estrutura química do precursor alcóxido TEOS (KUNST <i>et al.</i> , (2014-B))....	32
Figura 6. Estrutura química do precursor alcóxido MAP (BENTISS; PHAN; JAMA, 2015).....	32
Figura 7. Fluxograma das etapas desta pesquisa.....	41
Figura 8. Difratoograma das partículas de Biovidro F18.....	51
Figura 9. Curva TG dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18.	52
Figura 10. Curva DTG dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 curados a 90°C...53	
Figura 11. FTIR de (a) Filme MAP/TEOS líquido; (b) Filme MAP/TEOS curado a 90°C; (c) Filme MAP/TEOS/F18 líquido e (d) Filme MAP/TEOS/F18 curado a 90°C.	54
Figura 12. MEV-FEG para todas amostras; (a) LTi-SLix, (b) LTi-Lix, (c) LTi-SLix-Sol, (d) LTi-Lix-Sol, (e) LTi-SLix-Sol-F18, (f)LTi-Lix-Sol-F18.....	56
Figura 13. Micrografias de força atômica dos sistemas: (a) LTi-SLix, (b) LTi-Lix, (c) LTi-SLix-Sol, (d) LTi-Lix-Sol, (e) LTi-SLix-Sol-F18, (f)LTi-Lix-Sol-F18.....	58
Figura 14. Micrografias obtidas por FEG para estimar a espessura do filme dos sistemas: (a) LTi-SLix-Sol, (b) LTi-Lix-Sol, (c) LTi-SLix-Sol-F18, (d)LTi-Lix-Sol-F18. .60	
Figura 15. Micrografias do teste de aderência dos sistemas substrato-filme: (a) LTi-SLix-Sol, (b) LTi-Lix-Sol, (c) LTi-SLix-Sol-F18, (d)LTi-Lix-Sol-F18.	61
Figura 16. EDS para os quatros sistemas substrato-filme: (a) LTi-SLix-Sol, (b) LTi-Lix-Sol, (c) LTi-SLix-Sol-F18, (d)LTi-Lix-Sol-F18.	62

Figura 17. Ensaio de molhabilidade dos substratos sem e com lixamento e dos sistemas substrato-filme MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 de por Ângulo de contato.....	63
Figura 18. Molhamento da gota sobre a superfície rugosa segundo o modelo de Cassie Baxter. Adaptado de Cengiz; Cansoy (2014).	64
Figura 19. Curvas de Potencial de Circuito Aberto para todas as amostras.....	66
Figura 20. Micrografias no MEV-FEG em 1 (um) dia de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-SLix; (b) LTi-SLix-Sol e (c) LTi-SLix-Sol-F18.....	70
Figura 21. Micrografias no MEV-FEG em 4 (quatro) dias de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-SLix; (b) LTi-SLix-Sol e (c) LTi-SLix-Sol-F18.....	71
Figura 22. Micrografias no MEV-FEG em 7 (sete) dias de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-SLix; (b) LTi-SLix-Sol e (c) LTi-SLix-Sol-F18.....	72
Figura 23. Micrografias no MEV-FEG em 1 (um) dia de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-Lix; (b) LTi-Lix-Sol e (c) LTi-Lix-Sol-F18.....	75
Figura 24. Micrografias no MEV-FEG em 4 (quatro) dias de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-Lix; (b) LTi-Lix-Sol e (c) LTi-Lix-Sol-F18.....	76
Figura 25. Micrografias no MEV-FEG em 7 (sete) dias de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-Lix; (b) LTi-Lix-Sol e (c) LTi-Lix-Sol-F18.....	77
Figura 26. Viabilidade celular avaliado em 1, 4 e 7 dias de contato das células MG-63 com as amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. As letras acima das barras correspondem as comparações dos diversos grupos com o grupo controle; letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre os grupos.	79
Figura 27. Viabilidade celular avaliado em 1, 4 e 7 dias de contato das células MG-63 com as amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. As letras acima das barras correspondem as comparações dos diversos grupos com o grupo controle; letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre os grupos.	80
Figura 28. Microscopia de fluorescência para verificação das células vivas e mortas sobre a superfície das amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18.....	83

Figura 29. Contagem das células viáveis, em apoptose inicial e apoptose final/necrose para os sistemas LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18 nos tempos de 1 dia, 4 e 7 dias em contato com as células MG-63.	84
Figura 30. Microscopia de fluorescência para verificação das células vivas e mortas sobre a superfície das amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18.	85
Figura 31. Contagem das células viáveis, em apoptose inicial e apoptose final/necrose para os sistemas LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18 nos tempos de 1 dia, 4 e 7 dias em contato com as células MG-63.	86

RESUMO

A liga Ti-6Al-4V é amplamente utilizada como biomaterial, no entanto, quando em aplicação apresenta algumas desvantagens como a corrosão e o comportamento bioinerte. A corrosão está associada a ação agressiva do ambiente corpóreo em contato com a liga e, o comportamento bioinerte ocorre pela inexistência de interação química e biológica do sistema ósseo com a liga. Estudos na área de biomateriais sugerem o uso de filmes protetivos e biofuncionalizados para conferir a resistência à corrosão, pelo efeito barreira do filme, e a bioatividade na superfície do implante, pela incorporação de partículas bioativas. Neste contexto, esta pesquisa propõe depositar sobre a superfície da liga Ti-6Al-4V um filme composto somente por organosilano e outro filme de organosilano contendo biovidro. Também, foi avaliado os efeitos da rugosidade do substrato na resistência à corrosão, pela aderência do filme, e atividade biológica. Os filmes foram preparados pelo processo sol-gel e depositados pelo método *dip-coating*. O substrato com e sem lixamento e, os sistemas substrato-filme, foram caracterizados quanto a sua morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo, Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia. Para os substratos e sistemas substrato-filmes também, foi determinada a molhabilidade por ângulo de contato, a aderência do filme ao substrato pela norma ASTM D3359-09, a rugosidade por Microscopia de Força Atômica e a resistência à corrosão por Potencial de Circuito Aberto. Também foi investigada a atividade biológica dos substratos e sistemas substrato-filme, no que se refere à morfologia das células, viabilidade e citotoxicidade celular. Destacam-se como principais resultados, (i) o aumento da resistência à corrosão da Ti-6Al-4V, para o substrato sem lixamento e com filme de organosilano e para o substrato-filme com biovidro; (ii) todas as amostras apresentaram caráter hidrofílico, dos quais, o filme de organosilano, aplicado sobre os substratos sem e com lixamento, apresentaram os maiores ângulos de contato (73° a 75°); (iii) crescimento celular em todas as condições testadas. Pelo ensaio morfológico, a rugosidade do substrato modulou a morfologia celular, pois a maior rugosidade das amostras LTi-SLix ($R_a=7,60$ nm) e LTi-SLix-Sol-F18 ($R_a=16,61$ nm) favoreceu uma maior área de contato para células do que o substrato LTi-SLix-Sol ($R_a=10,12$ nm), o que viabilizou maior proliferação celular. Para as amostras lixadas, observou-se o mesmo comportamento, onde nos sistemas LTi-Lix ($R_a=14,07$ nm) e o LTi-Lix-Sol-F18 ($R_a=20,71$ nm) foi observado maior densidade celular, em relação a amostra LTi-Lix-Sol ($R_a=11,30$ nm). Na análise de citotoxicidade não foi observado a morte celular, indicando que todas condições testadas favoreceram a viabilidade celular.

Palavras-chave: Ti-6Al-4V, corrosão, pré-tratamento, filme de organosilanos, Biovidro F18, bioatividade.

ABSTRACT

The alloy Ti-6Al-4V is widely used as a biomaterial. However, it has some disadvantages such as bioinert behavior and susceptibility to corrosion, which leads to the release of aluminum and vanadium ions. Corrosion occurs due to the direct contact of the alloy with the aggressive conditions of the body environment. On its turn, the bioinert behavior of the alloy Ti-6Al-4V is due to its lack of chemical and biological interaction with the bones, which causes its loosening and negatively affects its function. Several studies on biomaterials suggest the use of protective and biofunctionalized films to make metal alloys resistant to corrosion, which happens due to the barrier effect of the film, and to create a bioactive surface on the implant through the incorporation of bioactive particles. In this context, this research aims at depositing on the surface of the alloy Ti-6Al-4V two organosilane films. Both films have the same alkoxide precursors, but the second one also has bioglass. The effects of the substrate roughness on the corrosion resistance (due to film adhesion) and on the biological activity were also evaluated. The films were prepared by the sol-gel process and deposited by the dip-coating method. The substrate-film systems and the substrate not pretreated and pretreated by sanding were characterized for their morphology by Field Emission Scanning Electron Microscopy and by Energy Dispersive X-Ray Spectrometry. They were also characterized by their contact angle (determined by the sessile drop method), adhesion of the film to the substrate (using the ASTM D3359-09 standard method), roughness (by Atomic Force Microscopy), and corrosion resistance (measured by their open circuit potential). The biological activity of substrates and substrate-film systems was also investigated taking into account cell morphology, cell viability and cytotoxicity. The main results were: (i) the lower roughness Ti-6Al-4V metal substrates (not pretreated by sanding) with the MAP/TEOS and MAP/TEOSF18 films were more resistant to corrosion when compared to higher roughness metal substrates (pretreated by sanding). (ii) all samples are hydrophilic and the MAP/TEOS film presented the highest contact angle (from 73° to 75°); (iii) cell growth occurred despite the condition tested. According to the morphology results, the substrate morphology modulated the cell morphology. The higher surface roughness of the LTi-SLix (Ra=7.60 nm) and LTi-SLix-Sol-F18 (Ra=16.61 nm) samples resulted in a greater contact area for cells when compared to the LTi-SLix-Sol substrate (Ra = 10.12 nm). This enabled greater cell proliferation. The same was observed for the samples pretreated by sanding. The LTi-Lix (Ra=14.07 nm) and LTi-Lix-Sol-F18 (Ra=20.71 nm) systems presented a higher cellular density when compared to the LTi-Lix-Sol sample (Ra=11.30). With regard to the cytotoxicity, no cell death was observed, which means that all surfaces tested favor cell viability.

Keywords: Ti-6Al-4V, corrosion, pretreatment, organosilane film, Bioglass F18, bioactivity.

1 INTRODUÇÃO

No decorrer dos últimos dois séculos, os biomateriais vêm sendo aplicados na área ortopédica em procedimentos como fixação de fraturas e ligamentos, reparação de cartilagens e menisco e substituição óssea. Além disso, são usados em sistemas de liberação controlada de fármacos e em acessórios cirúrgicos, como os parafusos, pinos e placas (IBRAHIM, *et al.*, 2017; SU, *et al.*, 2017). Dentre as aplicações citadas, são amplamente empregados, na área ortopédica, os implantes metálicos, devido a sua elevada resistência mecânica em relação aos demais tipos de biomateriais (CHOUDHURY; AGRAWAL, 2011).

No segmento de biomateriais metálicos, a liga de Ti-6Al-4V é amplamente utilizada, pois, apresenta maior resistência à fratura, à tração e limite de escoamento. Além de possuir módulo de elasticidade próximo ao osso, em comparação aos demais biomateriais metálicos (CHIU *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2012). No entanto, a liga Ti-6Al-4V apresenta algumas desvantagens, como a liberação de íons alumínio (Al) e vanádio (V) e o comportamento bioinerte (PUNT *et al.*, 2008; CREMASCO, *et al.*, 2011; CHEN; THOUAS, 2015; VERONESI, *et al.*, 2017).

Estudos indicam que a liberação de íons metálicos, ou seja, a corrosão pode ocorrer pela ação de dois fatores: i) o atrito direto entre o osso e o implante, que ocasiona um acentuado desgaste nas duas interfaces e, conseqüentemente, promove a liberação dos íons do metal no interior do corpo humano; ii) o ambiente agressivo do meio fisiológico, que pode resultar em corrosão do metal. Ambos os fatores, podem ocasionar processos inflamatórios e alérgicos no corpo do hospedeiro, devido a liberação de íons metálicos (RODRÍGEUZ-CANO *et al.*, 2013; IBRAHIM, *et al.*, 2017).

O comportamento bioinerte ou biotolerável é caracterizado pela inexistência de interação química e biológica do sistema ósseo com a liga, o que pode ocasionar o crescimento de um tecido fibroso no entorno do implante, que ocasiona o afrouxamento do mesmo e, conseqüentemente, prejudica sua função (ZOMORODIAN *et al.*, 2012; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; EL-GHANNAM; DUCHEYNE, 2017).

Vários estudos na área de biomateriais sugerem o uso de filmes protetivos e biofuncionalizados para conferir a resistência à corrosão e a bioatividade na superfície

do implante. Esses revestimentos, podem ser depositados por diferentes técnicas, como a deposição física de vapor (PVD), deposição eletroquímica, pulverização por plasma e imersão sol-gel (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; AYDINOGLU; YORUÇ, 2016).

A deposição por sol-gel é considerada um dos métodos mais promissores, de baixo custo, para a deposição de revestimentos funcionais. Além de possuir afinidade com uma ampla gama de materiais, pode conferir ao substrato metálico a resistência à corrosão, biocompatibilidade e bioatividade, pois esse filme permite a incorporação de partículas bioativas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; AYDINOGLU; YORUÇ, 2016; EL-GHANNAM, DUCHEYNE, 2017).

As partículas bioativas são responsáveis pela interação com o tecido adjacente, o que promove a ocorrência de interações químicas e biológicas na interface implante-tecido. Essas partículas favorecem a formação de hidroxiapatita carbonatada com ação de atrair células osteoclastos. Como exemplos dessa classe de materiais bioativos, destacam-se a hidroxiapatita, os biovidros e as vitrocerâmicas (HENCH, 2002; HALLAB; JACOBS, 2013; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Neste contexto este trabalho visa o estudo comparativo e desenvolvimento de uma metodologia que possibilite depositar um filme de organosilano MAP/TEOS e outro contendo biovidro, sob o substrato metálico da liga Ti-6Al-4V, buscando melhorar as propriedades biomédicas e a resistência a corrosão do mesmo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resistência à corrosão, viabilidade e citotoxicidade celular da superfície de Ti-6Al-4V revestida com filmes de organosilanos e biovidro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a morfologia, efeito protetivo, molhabilidade, rugosidade e a aderência dos filmes de organosilano contendo e não partículas de Biovidro F18, ambos compostos pelos precursores alcóxidos de silício tetraetoxisilano (TEOS) e 3-trimetoxisilil-propil-metacrilato (MAP) sobre a liga Ti-6Al-4V, com e sem lixamento;

Determinar a influência da incorporação de partículas do Biovidro F18 nas propriedades como, molhabilidade, aderência, rugosidade e interações químicas com o filme TEOS/MAP depositado sob a liga Ti-6Al-4V;

Avaliar a bioatividade do filme MAP/TEOS contendo partículas de biovidro sobre a superfície do substrato Ti-6Al-4V pelos ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são materiais biocompatíveis aplicados na restauração ou substituição de tecido, órgão ou função do corpo humano, que deixaram de exercer seu ofício. São, portanto, definidos, como qualquer substância ou combinação de substâncias (exceto fármacos), de origem artificial ou natural, utilizados para assumir ou restaurar a forma e/ou a função, parcial ou total, da estrutura biológica do corpo humano, perdida ou debilitada de modo contínuo ou intermitente (BHAT; KUMAR, 2013; CHEN; THOUAS, 2015).

Na ortopedia, o interesse na utilização de biomateriais está voltado ao uso de dispositivo de fixação interna de fraturas ósseas e na reposição de articulações. Grande parte dessa demanda é ocasionada por acidentes e doenças degenerativas, as quais implicam na degradação das propriedades mecânicas dos ossos, devido à ausência do processo biológico de autocura (GEETHA *et al.*, 2009; ASRI *et al.*, 2017; CHEN; THOUAS, 2015).

Na área ortopédica, o material a ser empregado para a reconstrução do tecido ósseo deve cada vez mais atender os requisitos biológicos que propiciem a cicatrização e formação desse tecido. Sendo assim, é de grande importância que os biomateriais apresentem propriedades biológicas como biocompatibilidade, biofuncionalidade e osteocondutibilidade (ANDRADE, *et al.*, 2007; ROMAGNOLI; BRANDI, 2014; PIRES, 2015; SU *et al.*, 2017).

Seguindo esse contexto, a biocompatibilidade é uma propriedade caracterizada por evitar a ocorrência de reações imunológicas locais e danos que prejudiquem o paciente, ocasionados pela rejeição do corpo humano a tecidos, órgãos e a sistemas afastados do local implantado (GEETHA *et al.*, 2009; FERRARIS *et al.*, 2014; PIRES, 2015; SU *et al.*, 2017). Enquanto que, a biofuncionalidade é caracterizada por realizar a função semelhante à do sistema substituto, imediatamente após a implantação (OLIVEIRA *et al.* 2010; ROMAGNOLI E BRANDI, 2014). E por fim, a osteocondutibilidade é a propriedade capacitada em atrair células osteoblastos para a região comprometida. Estas células são responsáveis pela formação do tecido ósseo,

atuando na sintetização dos componentes de matriz orgânica e controlando a formação dessa matriz (ANDRADE, *et al.*, 2007).

Diante da reação do organismo vivo sobre o sistema implantado, os biomateriais podem ser classificados pelo seu comportamento fisiológico, em: bioinertes, biotoleráveis, bioativos e reabsorvíveis (HENCH, 2002; ISAAC *et al.*, 2010; RAKMAE *et al.*, 2012; ZOMORODIAN *et al.*, 2012).

Bioinerte é a classe de biomateriais que são tolerados pelo organismo, onde a resposta local do sistema imunológico é praticamente inexistente, podendo ocorrer a formação de um tecido fibroso em volta do implante. Os materiais mais utilizados nesta classe são alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e aço inoxidável (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; EL-GHANNAM; DUCHEYNE, 2017). Os materiais biotoleráveis são tolerados pelo organismo e o implante é isolado pelo seu encapsulamento por um tecido fibroso. Este isolamento é induzido devido a liberação de íons e produtos de desgaste e corrosão. A espessura do tecido fibroso é proporcional a tolerabilidade do organismo ao implante. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros e a maioria dos metais (ISAAC *et al.*, 2010; ZOMORODIAN *et al.*, 2012). Bioativo é a classe de materiais que permite uma resposta biológica específica na interface do implante com o tecido vivo. Esta ligação somente é possível pela similaridade química existente entre o tecido ósseo e o implante, conferindo na osteocondutibilidade. Esta ação somente é possível devido ao recobrimento da superfície do material por células ósseas. Os materiais bioativos são os biovidros, as vitrocerâmicas bioativas e as cerâmicas do sistema fosfato de cálcio, sendo que neste último, a mais importante é a hidroxiapatita (RAKMAE *et al.*, 2012). Os materiais reabsorvíveis são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo receptor após um certo tempo em contato com o ambiente corpóreo. Os principais materiais desta classe são fosfato tricálcio (TCP) e ácido polilático (GODAVITAME *et al.*, 2017).

Diante das propriedades biológicas e da classificação dos biomateriais, o critério de seleção do material deve ser fundamentado na aplicação a que se destina e deve levar também em consideração as suas propriedades físicas, químicas e mecânicas. Na ortopedia, os materiais comumente utilizados são os metálicos como, o aço inoxidável

austenítico 316L, as ligas de cobalto-cromo-molibdênio (Co-Cr-Mo) e cobalto-níquel-cromo-molibdênio (Co-Ni-Cr-Mo), titânio puro e suas ligas (CHEN; THOUAS, 2015).

3.1.1 Biomateriais metálicos

A necessidade de reparar a estrutura óssea comprometida, foi marcada pelo uso de implantes metálicos. No entanto, poucas tentativas de aplicação destes dispositivos obtiveram sucesso até o desenvolvimento da cirurgia asséptica de Lister, implementada na década de 1860 (CHEN; THOUAS, 2015; MANAM, *et al.* 2017). Desde então, materiais metálicos desempenham um importante papel na cirurgia ortopédica.

A aplicação da classe metálica de biomateriais é abrangente, sendo utilizada em dispositivos ortopédicos temporários (pinos e parafusos, placas ósseas) e implantes permanentes (substituição total das articulações) (NAVARO, *et al.*, 2008; NIINOMI; NAKAI; HIEDA, 2012).

Os dispositivos temporários atuam como estrutura de suporte para o segmento ósseo fraturado, durante o período de materialização do mesmo, sendo removido cirurgicamente após o final do processo. Os dispositivos permanentes demandam propriedades mecânicas adicionais devido ao fato de estarem submetidos às solicitações cíclicas do movimento do corpo humano e à transmissão de cargas, anteriormente imposta a articulação suprida (NAVARO, *et al.*, 2008).

Neste contexto, os biomateriais metálicos estão divididos em três gerações. A primeira é caracterizada pelo aço inoxidável, liga comumente utilizada em implantes temporários. Na segunda geração se inclui a liga de cobalto-cromo (Co-Cr), utilizada nas articulações artificiais de quadril e joelho devido à sua capacidade de resistência ao desgaste. A terceira geração engloba o titânio e suas ligas, utilizadas como implante permanente devido às propriedades mecânicas, comportamento bioinerte e resistência ao desgaste superior aos demais metais (SHI; GUO; LIU, 2015).

Os aços inoxidáveis, utilizados em implantes temporários, apresentam baixa resistência ao desgaste, podendo propiciar a liberação de partículas ou íons metálicos (*debris*). Os *debris* podem acumular-se no organismo, implicando em reações infecciosas e a rejeição do material, além de serem aderentes aos tecidos prejudicando

a atividade e desenvolvimento dos mesmos (NAVARO, *et al.*, 2008; GEETHA, *et al.*, 2009).

A existência de *debris*, colaborou com a admissão das ligas de Co-Cr nos implantes permanentes. Pois esta liga apresenta propriedades superiores aos aços inoxidáveis como elevada dureza, resistência mecânica e ao desgaste/corrosão, inclusive em meios salinos, propiciando seu uso neste segmento. No entanto, o módulo de elasticidade desta liga é elevado, em aproximadamente 220-230 GPa, em relação ao osso, que apresenta um range em torno de 10-30 GPa, caracterizando um comportamento elástico (GEETHA, *et al.*, 2009).

Em regime elástico, quando combinado com um material de maior rigidez, este impede a transferência das solicitações mecânicas submetidas ao segmento ósseo. Desta forma, ocorre a supressão dos estímulos produzidos pela estrutura óssea e, portanto, acarretando em sua atrofia, ou seja, desestimulando a sua aplicação no organismo. Esse processo implica na perda do tecido, prejudicando a integridade da interface osso-implante podendo ocasionar sua falha (NAVARO, *et al.*, 2008; GEETHA, *et al.*, 2009).

O titânio comercialmente puro (Ti-cp), diferente dos outros materiais metálicos utilizados em implantes, apresenta excelente biocompatibilidade e menor módulo de elasticidade, aproximadamente 100 GPa, apresentando módulo de elasticidade próximo ao do osso, em torno de 10 a 30 GPa. Essa característica viabiliza a transferência de esforços mecânicos do tecido ósseo para o implante e vice-versa, pois quanto maior a diferença do módulo de elasticidade entre o implante e o osso adjacente a ele, maior é a probabilidade do desgaste do implante e falha do mesmo (CHEN; THOUAS, 2015).

No entanto, a quebra de parafusos de Ti-cp, em decorrência da baixa resistência a torção, levou ao uso da liga Ti-6Al-4V, desenvolvida para aplicações aeroespaciais (CUI, *et al.*, 2011). Esta liga apresenta características das quais a aproximam das ideias para funcionar como parte integrante do osso. Este material possui limite de resistência a fratura cerca de 6x maior que do Ti-Cp e módulo de elasticidade em torno de 110-120 GPa. Além disso, possui uma densidade inferior aos demais materiais biometálicos, aproximadamente 4,45 g.cm⁻³, caracterizando sua leveza. Entretanto,

este material propicia uma menor taxa de osseointegração e maior susceptibilidade à desgaste/corrosão *in vivo*, em relação ao Ti-cp. (GEETHA, *et al.*, 2009; CUI, *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2014; CHEN; THOUAS, 2015; HARADA *et al.*, 2016).

Pelas vantagens apresentadas, mundialmente a liga Ti-6Al-4V é mais utilizada na confecção de implantes ortopédicos. A longo prazo, esse material pode propiciar falhas devido à suscetível liberação de íons metálicos, pelo processo de corrosão e/ou desgaste e a falta de bioatividade (GEETHA, 2009; ZHENG *et al.*, 2014; CHEN; THOUAS, 2015; HARADA *et al.*, 2016).

3.1.2 Liga de Ti-6Al-4V

A origem da liga Ti-6Al-4V (6% de alumínio, 4% de vanádio e 90% de titânio) ocorreu devido à necessidade de modificar as propriedades mecânicas (fratura, fadiga e dureza) do Ti-cp, pois, apesar de sua excelente resistência à corrosão, o mesmo não é ideal para implantes sujeitos a contínuos esforços mecânicos (AHMED *et al.*, 2016).

Atualmente, Ti-6Al-4V, é a liga mais utilizada no segmento biomédico, pois apresenta uma ótima combinação de características como baixa densidade, usinabilidade, capacidade de forjamento e estabilidade estrutural (CHEN; THOUAS, 2015; AHMED *et al.*, 2016). Estas propriedades são provenientes da sua microestrutura, a qual apresenta duas fases α e β , a temperatura ambiente, ocasionada pela presença dos elementos de liga alumínio e vanádio (AHMED, *et al.*, 2016; MATSUMOTO *et al.*, 2016).

O alumínio, estabilizante da fase α , propicia resistência em altas temperaturas, conferindo a liga Ti-6Al-4V maior resistência mecânica e menor capacidade de deformação do material (BEL`SKAYA; KULYAMINA, 2014; MATSUMOTO *et al.*, 2016). Com relação ao vanádio, estabilizador da fase β , este apresenta características similares ao alumínio além de conceder resistência à corrosão e baixo módulo de elasticidade (LÜTJERING; WILLIAMS, 2007; ZIMMER, 2011).

Embora as concentrações de Al e V na liga sejam relativamente baixas, esta confere uma mudança significativa na resistência a fratura (propagação de trincas), fadiga (ruptura por esforços repetitivos), módulo de elasticidade, dureza, microestrutura e alongamento. Apesar do módulo de elasticidade permanecer

inalterado, em relação ao Ti-cp, essas características fazem da liga Ti-6Al-4V a mais estudada e indicada na aplicação biomédica.

Para garantir a qualidade e as propriedades da liga Ti-6Al-4V, para aplicação biomédica, o substrato deve atender as normas ASTM F1472-14 e F1108-14, citadas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades mecânicas requeridas à liga Ti-6Al-4V

	Ti-6Al-4V ^(a)	Ti-6Al-4V ^(b)	Ti-6Al-4V ^(c)
Limite de escoamento (MPa)	950	758	860
Limite de ruptura (MPa)	1020	860	930
Alongamento (%)	14	>8	>10
Resistencia à fadiga* (600 MPa)	>10.000.000 ciclos		
Dureza de Rockwell (HRC)	33		
Módulo de elasticidade (GPa)	120		

*após a prensagem isostática a quente; (a) material típico; (b) material moldado (ASTM F1472-14); (c) material forjado (ASTM F1108-14)

No entanto, o desempenho a longo prazo do Ti-6Al-4V, como implante ortopédico, levantou algumas preocupações devido a liberação de íons alumínio e vanádio decorrentes da sua corrosão, pela ação agressiva do ambiente corpóreo. Tais íons exibiram toxicidade aos tecidos conferindo reações inflamatórias e, por tanto, as intervenções cirúrgicas, o que indica sua falta de bioatividade (NAG *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2011; REZVANIAN *et al.*, 2016; MENGUCCI *et al.*, 2017). Porém, apesar da liga Ti-6Al-4V possuir estes pontos desfavoráveis, em relação ao Ti-cp, suas propriedades mecânicas e seu menor custo, viabilizam sua aplicação no setor biomédico e consequentemente a isso, pesquisas vem sendo realizadas para aumentar a resistência a corrosão e atribuir comportamento bioativo a liga Ti-6Al-4V (KOIKE *et al.*, 2005; REZVANIAN *et al.*, 2016; MENGUCCI *et al.*, 2017).

3.2 CORROSÃO DA LIGA LTi-6Al-4V

A corrosão é definida como a degradação do material por reações químicas entre sua superfície e o ambiente em que se encontra. No corpo humano, a corrosão dos materiais metálicos ocorre lentamente pela ação eletroquímica, uma vez que o material

é inserido. Neste momento, o corpo produz um fluido reativo constituído por células, água, íons, plasma, proteínas e aminoácidos que reagem por reações eletroquímicas com o biomaterial (ABDULHAMEED, 2011; YANG; REN, 2010).

Antes de abordar os mecanismos de corrosão atuantes nos implantes ortopédicos, é importante relatar o motivo pelo qual os materiais, normalmente resistentes à corrosão, se degradam quando expostos ao ambiente corpóreo. O organismo humano é um ambiente aquoso quente ($\sim 37^{\circ}\text{C}$) e salino, onde compostos químicos contribuem para a corrosão dos metais *in vivo*, dentre esses compostos podemos citar o oxigênio, carbono, hidrogênio e nitrogênio, sendo os elementos mais abundantes, complementados por cálcio, fósforo, potássio, enxofre, cloro, sódio magnésio, entre outros (LIU, *et al.*, 2013; ASRI, *et al.*, 2017).

Além disso, o pH do corpo varia de acordo com a localização e tempo. Em geral, o pH dos fluidos corporais, na maioria das aplicações ortopédicas, varia de 6,8 para 7,78 (LIU, *et al.*, 2013). Em algumas situações em que a inflamação está presente, é possível alcançar um pH em torno de 5, o que propicia a corrosão das ligas ortopédicas (MATHEW *et al.*, 2012; SILVA-BERMUDEZ; RODIL, 2013).

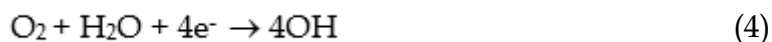
O mecanismo de corrosão é caracterizado pela existência de processos anódicos e catódicos que ocorrem na superfície metálica, na interface metal/solução, bem como, na interface óxido/solução (MATHEW *et al.*, 2012; SILVA-BERMUDEZ; RODIL, 2013).

O processo anódico é caracterizado pela oxidação do metal, ou seja, sua corrosão. A reação química (1) representa este processo, onde M representa o metal.



O processo catódico é caracterizado pelo consumo dos elétrons produzidos no processo anódico. A reação catódica resultante dependerá da química do eletrólito. No entanto, alguns dos ambientes mais comuns dizem respeito às reações químicas 2 a 4, sendo a reação química (2) a evolução do hidrogênio, (3) redução de oxigênio em soluções ácidas e (4) redução de oxigênio em soluções base ou alcalinas.





A pesquisa realizada por Moraes *et al.*, 2007, aborda a corrosão da liga Ti-6Al-4V *in vivo*. Nesse estudo os autores identificaram a liberação de íons metálicos por mini implantes ortodônticos confeccionados com a liga Ti-6Al-4V após inseridos no organismo de coelhos. Verificaram a presença de diversas quantidades de íons Ti, Al e V em diferentes órgãos (rins, fígado e pulmões) dos animais tratados, o que comprova a possibilidade de liberação de íons metálicos por esse tipo de implante (MORAIS, *et al.*, 2007).

Em seu estudo, Al-Mobarack (2012), discutiu sobre a resistência à corrosão da liga Ti-6Al-4V em contato com uma solução simuladora do fluido corpóreo, à 37°C, com aeração. O autor constatou danos na superfície do metal e metalose (processo de desgaste da prótese dentro do organismo humano e à necrose de tecidos no local ou próximo ao local onde a prótese foi implantada) em regiões próximas ao mesmo, provenientes de partículas e resíduos metálicos iônicos, indicando provável falhas *in vivo* no biomaterial Ti-6Al-4V.

Os estudos acima citados, sobre corrosão em fluido corpóreo da liga Ti-6Al-4V, confirmam a teoria que quando um metal é imerso em uma solução ocorre a hidratação dos íons metálicos na sua interface com o eletrólito, conforme representado esquematicamente na Figura 1, adaptada de Stansbury; Buchanan (2000). Essa reação resulta em uma camada de água no metal, que libera íons metálicos solvatados na solução, deixando-o carregado negativamente. O acúmulo de cargas negativas na superfície do implante induz o alinhamento de cargas positivas no eletrólito, conseqüentemente, promovendo uma diferença de potencial (ddp). A partir do instante que ocorre o alinhamento das cargas, iniciarão as reações eletroquímicas, nas quais um íon deixa o metal e vai para o eletrólito e vice-versa, resultando na sua deterioração (STANSBURY; BUCHANAN, 2000; BRYANT; NEVILLE, 2016).

No processo de deterioração eletroquímica, a liberação de íons metálicos para o meio pode implicar em alterações indesejáveis tais como desgaste, variações químicas ou modificações estruturais, as quais torna o implante inadequado ao uso e suscetível a ocasionar diversas reações prejudiciais ao corpo hospedeiro (AHMED *et al.*, 2016).

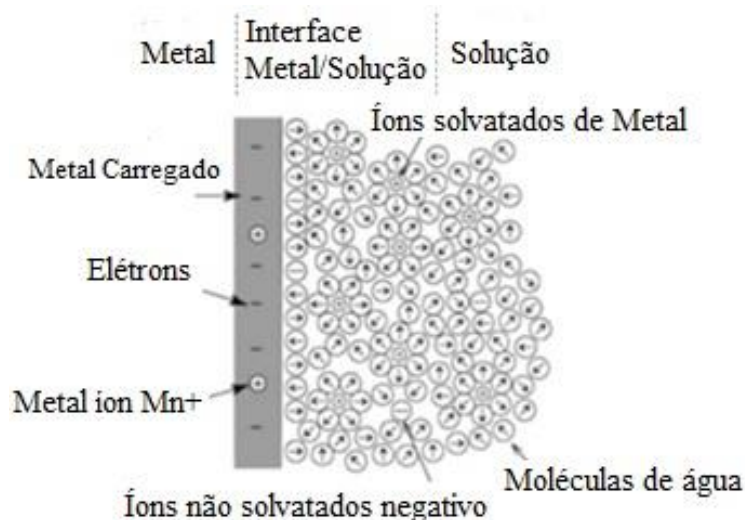


Figura 1. Representação da interação eletroquímica entre a interface do metal e a solução aquosa. Adaptado de Stansbury; Buchanan (2000).

Referente à liga Ti-6Al-4V, os elementos Al e V, adicionados para melhorar a resistência mecânica do Ti-cp, aumentam a velocidade de dissolução anódica do óxido de titânio (TiO_2), o que confere maior instabilidade ao seu óxido superficial, tornando a liga suscetível a corrosão (ASRI *et al.*, 2017; MANAM *et al.*, 2017).

Portanto, a dissolução do óxido que protege a superfície do material, combinada com as reações químicas decorrentes da influência do meio *in vivo*, resultam no processo de corrosão. Para favorecer a aplicação da liga Ti-6Al-4V em ambientes agressivos, é necessário que a mesma passe por alterações superficiais e/ou filmes protetivos para melhorar sua resistência superficial contra a corrosão.

3.3 REVESTIMENTOS DE BIOMATERIAIS

Pesquisadores têm confirmado que revestimentos depositados sobre substrato a base de titânio, como a liga Ti-6Al-4V, podem atuar como barreira física anticorrosiva, os quais previnem a liberação de íons metálicos para o organismo do hospedeiro. Além disso, alguns revestimentos são propícios a conter materiais cerâmicos bioativos, dessa forma, transformando a propriedade bioinerte do implante metálico em bioativo, propiciando uma superfície biofuncionalizada e com maior resistência à corrosão (HÖHN; VIRTANEN, 2015; MANAM, *et al.*, 2017).

Neste contexto, as técnicas mais difundidas de obtenção de revestimentos, no âmbito dos biomateriais, são a deposição física de vapor (PVD), a deposição química em fase vapor (CVD), a deposição eletroquímica, a pulverização por plasma e os revestimentos/filmes obtidos pelo processo sol-gel (WANG *et al.*, 2009). Este último processo é um dos métodos mais promissores para a deposição de filmes funcionais de baixo custo e que possui afinidade com uma ampla gama de substratos, podendo conferir ao metal resistência à corrosão, biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade (BALLARRE *et al.*, 2011; KULKARNI *et al.*, 2014; CATAURO *et al.*, 2014).

3.3.1 Revestimentos obtidos pelo processo sol-gel

Uma das formas de modificar a superfície dos implantes metálicos consiste em, utilizar filmes que proporcionam uma barreira de contato entre o ambiente externo e o substrato, de forma, a auxiliar na resistência a corrosão (BALLARRE *et al.*, 2011). Além disso, o material sintetizado é capaz de interagir com diversas espécies como íons, complexos metálicos, enzimas, proteínas e entre outros. A característica de interação é de grande importância, pois viabiliza a incorporação de materiais cerâmicos bioativos, atribuindo ao filme esta propriedade (ZHELUDKEVICH *et al.*, 2006; BALLARRE *et al.*, 2013; WLADYMYR *et al.*, 2013; KREGIEL *et al.*, 2014).

Segundo Figueira (2014), filmes obtidos pelo processo sol-gel são considerados multifuncionais, pois apresentam uma ampla gama de propriedades, provenientes de sua estrutura composta por uma parte inorgânica e orgânica. Dentre os compostos utilizados para a preparação de novos materiais via processo sol-gel, para a parte inorgânica destacam-se os alcóxidos dos elementos de silício (Si-OR), alumínio (Al-OR), zircônio (Zr-OR) e titânio (Ti-OR). Para a parte orgânica, representada neste estudo com a letra R, há uma vasta diversidade de cadeias carbônicas, como por exemplo, metóxi (OCH₃), etóxi (OCH₂CH₃), n-propóxi (O(CH₂)₂CH₃) e o sec-butóxi (H₃C(O)CHCH₂CH₃).

Uma importante interação entre os componentes de natureza orgânica e inorgânica a ser citada é a ligação química, a qual é responsável pelas características do material como estrutura e grau de organização. Sendo assim, o tipo de ligações

e/ou interações entre os componentes orgânicos e inorgânicos os classificam como filmes híbridos, em três diferentes grupos: híbridos de classe I, II e III. Os híbridos orgânico-inorgânicos de classe I interagem por meio de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals ou ligações iônicas. Os híbridos de classe II são constituídos de estruturas nas quais os componentes orgânicos e inorgânicos são ligados de forma covalente e os de classe III, são baseados na combinação dos dois tipos de interação descritos nas classes I e II (CHUNG *et al.*, 2017). Como este estudo se deteve a utilizar organossilanos, os exemplos citados estarão relacionados aos alcóxidos de silício, que é um dentre as famílias dos alcóxidos.

A classe II relaciona os agentes de acoplamento, os quais apresentam um grupo funcional orgânico numa extremidade, representado neste estudo pela letra R' (Figura 2), grupo usado para formar a rede cristalina (polímero). Na outra extremidade da molécula, há grupos alcóxidos, Si(OR)₃, nos quais ocorre a hidrólise da parte orgânica R e a formação dos grupos siloxano (Si-OH) durante o processo sol-gel (CHUNG *et al.*, 2017). Essa molécula de silano, que apresenta em uma de suas extremidades um radical R', que caracteriza a parte orgânica, e na outra extremidade grupos alcóxidos, é classificada como monossilano. Quando a molécula de silano apresentar em ambas as extremidades somente grupos alcóxidos, esta será classificada como bisilano.

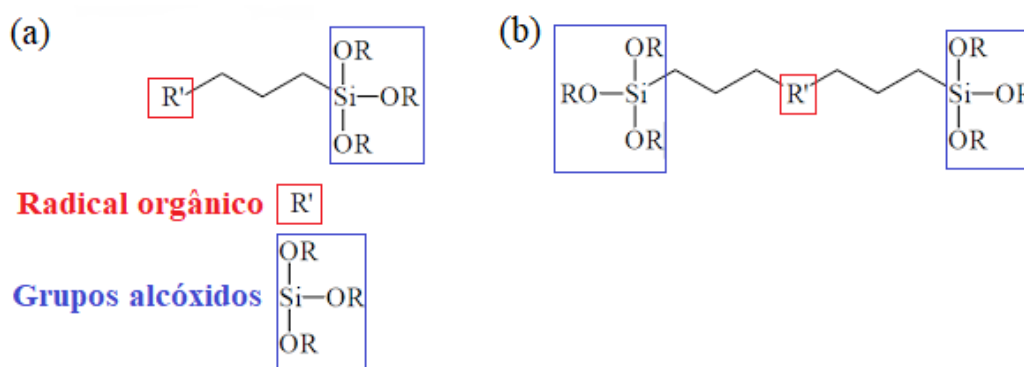


Figura 2. Estrutura química: (a) monossilano e (b) bisilano.

O uso de precursores contendo ligações não hidrolisáveis (R') permite que a rede orgânica seja diretamente ligada à rede inorgânica, para então agregar as características mecânicas e químicas das redes orgânica e inorgânica, oferecendo um filme híbrido com efeito barreira denso. Além disso, é possível combinar as vantagens

da fase inorgânica como alta estabilidade térmica e mecânica, resistência a solventes e ácidos, durabilidade e adesão ao substrato metálico com as da fase orgânica como elasticidade, flexibilidade, alta processabilidade, compatibilidade funcional com um segundo filme ou incorporação de particulados (ZHELUDKEVICH *et al.*, 2006; KREGIEL *et al.*, 2014).

O filme organosilano pode ser obtido na temperatura de aproximadamente 24°C, resultando em um líquido viscoso com cadeias de dimensões coloidais, fase “sol”, para um sólido elástico, devido a remoção do solvente, o qual forma uma rede tridimensional sólida entrelaçada macroscopicamente contendo a fase líquida aprisionada em seus interstícios, fase “gel”. Sendo assim, a formação da rede polimérica orgânica e inorgânica, ocorre a partir de reações de hidrólise, fase sol e, condensação, fase gel. (OWENS *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o processo de formação do filme organosilano a partir de precursores alcóxidos pelo método sol-gel ocorre em três etapas: hidrólise das moléculas organosilanos; deposição das moléculas hidrolisadas sobre o substrato metálico a partir da adsorção por ligações de hidrogênio e; condensação dessas moléculas depositadas nos substratos (GEETHA *et al.*, 2009; GABBARDO, 2014).

A hidrólise do precursor alcóxido, $R'(Si(OR)_3)$, quando em contato com a água/etanol, resulta na formação de grupos silanóis $R'(Si-OH)_3$ a partir dos grupos alcóxi da molécula de silano, Figura 3 (a). Essa etapa deve gerar quantidade suficiente de grupos silanóis na solução para a formação de um filme com boa qualidade. Em meio ácido, essa reação ocorre pelo ataque eletrofílico ao grupo R (grupo hidrolisável) da molécula $Si(OR)_3$. Portanto pHs mais ácidos favorecem a taxa de hidrólise, enquanto que pHs mais básicos favorecem a taxa de condensação. Segundo Oliveira (2006) e Salvador *et al.* (2017), o pH 4 apresenta maior eficiência de hidrólise para o sol MAP-TEOS, o que confere uma máxima velocidade de hidrólise das moléculas dos precursores alcóxidos e mínima a velocidade de condensação das moléculas de alcóxi-silano já hidrolisadas (silanol) em solução.

Após o tempo de hidrólise, a solução sol-gel é aplicada sobre a superfície do metal (M). Nessa etapa, alguns grupos silanóis $R'(Si-OH)_3$, provenientes da molécula de organosilano hidrolisada, estabelecem ligações de hidrogênio com os hidróxidos

presentes na superfície do metal (M-OH). Em concomitância, alguns grupos silanóis estabelecem ligações de hidrogênio entre si, Figura 3 (b).

Posterior a imersão no sol, o substrato metálico é retirado e submetido a um processo de secagem. Este processo influencia a velocidade das reações de condensação e a formação das ligações covalentes devido à evaporação das moléculas de água e álcool. A liberação dessas moléculas permite que as ligações de hidrogênio sejam transformadas em ligações metalosiloxano (M-O-Si) e siloxano (Si-O-Si) o que implica em uma melhor reticulação do filme (*cross-linking*), Figura 3 (c) (KREGIEL, 2014; KUNST *et al.*, 2014).

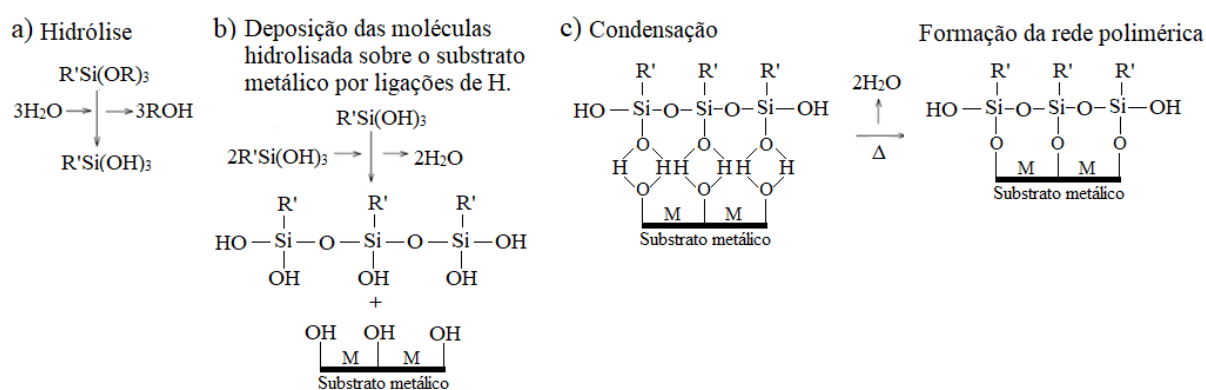


Figura 3. Etapas do processo de formação do filme organosilano a partir de precursores alcóxidos pelo método sol-gel: (a) hidrólise de um organosilano; (b) condensação do sol-gel sobre o substrato; (c) formação da rede polimérica a partir das ligações de hidrogênio. Adaptado de Kregiel, 2014.

A aplicação do filme sobre a superfície do substrato metálico pode ocorrer pelo método de *dip-coating* devido à baixa viscosidade final da solução sol-gel (KUNST *et al.*, 2014-A; TIAN *et al.*, 2015), apresentada esquematicamente na Figura 4.

Essa é uma técnica simples e de baixo custo que possibilita a aplicação do filme nas três dimensões. A técnica *dip-coating* consiste em quatro etapas sendo a etapa (1) a imersão do substrato no sol, (2) a retirada do substrato a uma velocidade controlada (Figura 4). Durante o movimento de retirada a suspensão é arrastada com o substrato, o que propicia a deposição do sol no metal, caracterizando a etapa (3). Em paralelo a etapa (3), ocorre a evaporação dos solventes, etapa (4), a qual propicia a condensação do filme organosilano e com isso formação da fase gel (GABBARDO, 2014; KUNST *et al.*, 2014-A; TIAN *et al.*, 2015).

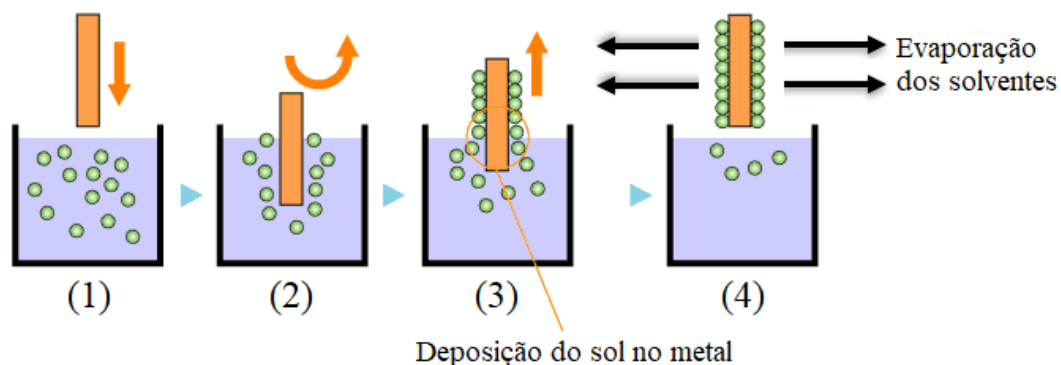


Figura 4. Esquema ilustrativo da técnica de dip-coating. Adaptado de Kunst, *et al.*, 2014.

Dentre os precursores alcóxidos, o alcóxido de silício possibilita um maior controle dos processos químicos envolvidos durante as reações de hidrólise (fase gel), devido à cinética lenta das reações na fase gel. Assim, é possível interferir no sistema de forma a arquitetar as propriedades finais dos materiais como, por exemplo, adicionar particulados para alterar as propriedades superficiais do filme, como rugosidade, porosidade e seu comportamento fisiológico. Adicionalmente, quando comparado a outros metais como titânio, zircônio ou alumínio, o silício, apresenta menor reatividade em relação a grupos quelantes presentes no sistema devido a liberação de moléculas orgânicas hidrolisadas e em processos de oxirredução que poderiam levar à formação de subprodutos (GABBARDO, 2014; KUNST *et al.*, 2014-A; TIAN *et al.*, 2015).

3.3.1.1 Precursores de Silício

Os silanos são compostos organofuncionais híbridos de cadeia orgânica e inorgânica (KUNST *et al.*, 2014-B; BENTISS; PHAN, 2015; CHUNG *et al.*, 2017). O alcóxido tetraetóxisilano (TEOS) é classificado como um precursor inorgânico, que possui o silício ligado a quatro grupos etóxidos (OCH_2CH_3), conforme mostrado na Figura 5. Esse precursor é comumente utilizado no processo sol-gel, pois apresenta grande facilidade em formar as ligações siloxano em temperatura ambiente (24°C), baixo custo e fácil adequação para obter filmes homogêneos em substratos de grande área. No entanto, o filme TEOS apresenta fragilidade devido à incorporação e

evaporação de produtos químicos, como H_2O , CH_3OH e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, após tratamento térmico. Para superar essas limitações, agentes de acoplamento são inseridos no sol para auxiliar na sintetização dos grupos silanóis penderes, que não foram condensados (SAKAI *et al.*, 2012; JAMA; KUNST *et al.*, 2014-B; BENTISS; PHAN, 2015; CHUNG *et al.*, 2017).

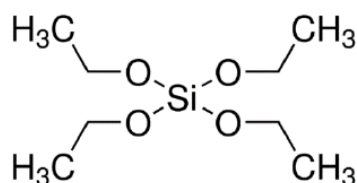


Figura 5. Estrutura química do precursor alcóxido TEOS (KUNST *et al.*, (2014-B)).

Neste contexto, o agente de acoplamento (trimetóxisililpropil)metacrilato (MAP) é um dos precursores mais utilizados para a preparação de revestimentos híbridos inorgânicos e orgânicos via sol-gel. Esse precursor é constituído pelo alcóxido de silício ligado a três grupos metóxidos (OCH_3) e um grupo orgânico de metacrilato de propil (Figura 6). Quando adicionado no sol, por ser um agente de acoplamento sintetizará os grupos silanóis penderes, além de propiciar a interação das redes orgânica e inorgânica. Desta forma, o agente de acoplamento tem a função de conferir um filme mais denso, com maior efeito barreira e, conseqüentemente maior resistência à corrosão do substrato (BENTISS; PHAN; JAMA, 2015; CHUNG *et al.*, 2017).

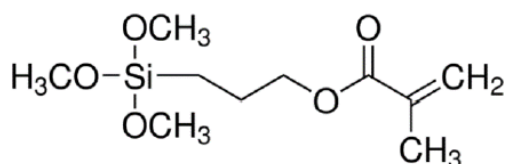


Figura 6. Estrutura química do precursor alcóxido MAP (BENTISS; PHAN; JAMA, 2015).

3.3.2 Pré-tratamentos e seus efeitos na adesão de filmes e na viabilidade celular

Antes da deposição de filmes finos normalmente é realizado um tratamento para alterar a rugosidade ou a composição superficial do substrato metálico, visando

melhorar a adesão do filme a superfície do metal, com o intuito de aumentar sua aderência e conseqüentemente sua resistência à corrosão (SALVADOR *et al.*, 2018).

A topografia, a rugosidade e a composição química da superfície dos implantes são parâmetros variáveis e que em conjunto influenciam na viabilidade, proliferação, diferenciação, ativação e morfologia celular. Embora haja diversos estudos sobre a relação da topografia e rugosidade com a bioatividade na superfície de um biomaterial metálico, a superfície ideal continua desconhecida (BAXTER, *et al.*, 2002; ROSA, *et al.*, 2013).

A literatura relata a existência de diversos tratamentos superficiais e técnicas para alterar a rugosidade superficial de implantes metálicos, todas elas com a finalidade de alterar a topografia e desencadear estruturas que possam melhorar a interação da superfície do biomaterial com o corpo. Dentre elas está o jateamento seguido por erosão ácida, o polimento e o lixamento mecânico e manual, a usinagem, o jateamento e o ataque ácido (ELIAS, MEIRELLES, 2010). Pré-tratamentos de lixamento e polimentos são frequentemente aplicados nas superfícies de implantes metálicos, conforme descrito a seguir.

Wennerberg e Albrektsson (2009), em seu estudo sobre a influência da rugosidade da superfície e topografia na interação tecido-biomaterial, demonstraram que implantes com rugosidade média, Sa , (parâmetro medido em escala 3-D e equivalente ao parâmetro de rugosidade Ra , em 2-D) entre 1 e 2 μm , apresentaram melhor aposição óssea e contato osso-implante que superfícies mais lisas (Sa menor que 0,5 μm) ou superfícies minimamente rugosas (Sa entre 0,5 e 1 μm). Essas características topográficas favoreceram a proliferação celular, corroborando com estudos de outros pesquisadores (BUSER, *et al.*, 1991; BUSER, *et al.*, 1999; NOVAES, *et al.*, 2002; BUSER, *et al.*, 2012).

Em outro estudo sobre rugosidade em implantes dentários, Albrektsson e Wennerberg (2004), desenvolveram uma classificação com o parâmetro média aritmética (Rz) nas seguintes categorias: liso (Rugosidade aritmética (Rz) < 0,5 μm), minimamente rugoso (Rz entre 0,5 - 1,0 μm), moderadamente rugoso (Rz entre 1,0 - 2,0 μm) e rugoso (Rz > 2,0 μm). Estes pesquisadores observaram que os implantes com

superfícies moderadamente rugosas (R_z entre 1,0 - 2,0 μm) apresentaram melhor resposta do tecido ósseo do que os implantes mais lisos ou com rugosidades maiores.

Entretanto há outros estudos que relacionam a rugosidade na escala nanométrica como promissora para a proliferação e viabilidade celular. Em seu estudo sobre a relação da rugosidade superficial e a resposta celular, onde o parâmetro R_a de suas amostras variou de 4 a 60 nm, Zareidoost, *et al.* (2012), relata que a rugosidade em escala nanométrica auxiliou na interação celular na interface osso-implante. Desta forma, promoveu a adesão osteoblástica, fenômeno essencial para a primeira interação osso-biomaterial, a qual se refere a manutenção da integridade do tecido, a cicatrização de feridas, a resposta imune e a integração do tecido/biomaterial.

Outros estudos revelam que topografias em escala micro e nanométrica podem modular efetivamente as respostas celulares, como adesão celular, proliferação e diferenciação de osteoblastos. Nestes estudos, os autores concluíram que os resultados parecem ser altamente dependentes da topografia, onde nano estruturas nodulares com 100 a 300 nm de diâmetro são relatadas para promover a proliferação e diferenciação de osteoblastos, assim como protuberâncias na faixa de 10 a 350 nm de altura e nanotubos com 80 nm em diâmetro interno também são citados para melhorar a proliferação celular (WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2009; GITTENS, *et al.*, 2011; ZAREIDOOST, *et al.*, 2012; OLIVARES-NAVARRETE, *et al.*, 2015; HUANG, *et al.*, 2016).

Neste sentido, acredita-se que o comportamento celular possa ser especificamente modulado ajustando as características topográficas nas escalas micro e nanométricas. Atualmente, há evidências insuficientes na literatura para tirar conclusões sobre a topografia que, deve ser aplicada em implantes metálicos para melhorar osseointegração. Assim, se faz necessário entender as interações celulares com as superfícies de rugosidade em escala micro e nanométrica, a fim de melhor projetar a topografia da superfície dos implantes. A relação entre nanoestruturas em superfícies microtopográficas e seus efeitos na modulação da resposta celular ainda precisa ser estudada (BIGGS, *et al.*, 2010; SJOSTROM, *et al.*, 2013; HUANG, *et al.*, 2016).

Para Biggs, *et al.* (2010), embora a topografia em microescala module significativamente o comportamento celular *in vitro*, as células *in vivo* entram em

contato com as características topográficas em escala nano e micrométrica. Além disso, estruturas subcelulares - incluindo elementos do citoesqueleto, proteínas transmembrana e filopodia - tendem para a escala nanométrica. Sendo assim, os tecidos de suporte extracelular também apresentam tipicamente uma complexa rede de sinais na escala nanométrica, composta por uma mistura complexa de poços, poros, protuberâncias e fibras de tamanho nanométrico (5-200 nm), sugerindo que a rugosidade em escala nano possui um papel promissor para a interação celular.

No entanto, visto que não há uma norma para análise da topografia da superfície de implantes, comparações utilizando os parâmetros de rugosidade devem ser interpretadas com cautela, pois o simples fato de escolha dos instrumentos de medição e técnicas podem influenciar fortemente o resultado de uma caracterização topográfica. Neste contexto, a topografia e rugosidade de um sistema deve sempre ser avaliado juntamente com ensaios *in vitro* ou *in vivo* (BIGGS, *et al.*, 2010; SJOSTROM, *et al.*, 2013; HUANG, *et al.*, 2016).

3.4 REVESTIMENTOS HÍBRIDOS E BIOATIVOS

Além da rugosidade, a porosidade, a estrutura cristalina e a composição química são parâmetros determinantes para a osseointegração dos implantes (BRACERAS *et al.*, 2007). Por isso, há pesquisas na área de biomateriais que se guiam no conceito de superfícies multifuncionais, as quais conferem ao implante resistência à corrosão e bioatividade (EL-GHANNAM, DUCHEYNE, 2017; ALVAREZ-URENA, *et al.* 2017).

Materiais bioativos, diferentemente dos implantes bioinertes, não estimulam o encapsulamento do dispositivo biomédico pela formação de tecidos fibrosos, mas propiciam a recuperação do tecido danificado. Quando um material bioativo é inserido no corpo humano, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorre na interface implante-tecido, as quais estão associadas a formação de hidroxiapatita carbonatada - matriz calcificada - pela ação das células osteoclastos (HENCH, 1998; HENCH, 2002).

Células osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo danificado, formando lacunas e labirintos que foram preenchidos por tecido vascular

e células osteogênicas (osteoblastos). Os osteoclastos liberam na matriz óssea fatores osteoindutivos aos osteoblastos, estimulando a formação de osso lamelar no interior dessas lacunas. Portanto, as chamadas biocerâmicas como a hidroxiapatita, fosfatos de cálcio e os vidros bioativos, estimulam esses processos físico-químicos sobre a superfície do implante, por apresentar elementos químicos semelhantes à hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) encontrada na matriz óssea (BRACERAS *et al.*, 2007; OSHIRO, 2016).

García *et al.* (2004), em seu estudo sobre revestimentos híbridos, obtidos pelo método sol-gel, com os derivados de silanos tetraetoxisilano (TEOS) e metiltrietoxisilano (MTES), cuja a solução hidrolisada foi aplicada sobre o substrato de aço inoxidável AISI 316L por *dip-coating*, verificaram a possibilidade de depositar sobre o filme sol-gel partículas cerâmicas bioativas. Os pesquisadores concluíram que o filme contendo o biovidro confere a propriedade bioativa à superfície do substrato, uma vez que, induz o filme a formação de uma película de hidroxiapatita, após algum tempo de imersão em fluido corporal sintético (SBF).

Ballarre *et al.* (2010), em seu estudo *in vivo*, utilizou como substrato o aço inoxidável AISI 316L, revestido por um filme híbrido obtido via processo sol-gel, composto por TEOS-MTES com a adição de 10 e 30% em massa de partículas colidais de cerâmica ($\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$). Nos ensaios de bioatividade, verificaram que o filme com material cerâmico apresentou melhores propriedades de osseointegração, evidenciadas pelo surgimento de hidroxiapatita após 30 dias de imersão em SBF.

Os vidros bioativos estimulam as funções de células multipotentes do estroma medular. A maior parte dos vidros bioativos são provenientes de sistemas à base de sílicas e, portanto, compostos geralmente por SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 . Porém, outros compostos podem ser inseridos, tais como CaF_2 , K_2O , MgO e B_2O_3 (BROWN, *et al.*, 2008; RAHAMAN, *et al.*, 2011).

3.4.1 Biovidro

Em seus estudos, Hench *et al.*, (1969), direcionados ao desenvolvimento de materiais quimicamente semelhantes à estrutura óssea, produziram diferentes vidros que apresentaram a capacidade de se ligar quimicamente com os tecidos vivos,

especialmente os tecidos duros. A partir desse momento, essa classe de vidros passou a ser classificada como biovidros ou vidros bioativos.

O 45S5, popularmente conhecido como Biovidro de Hench, foi o primeiro biovidro produzido por Hench *et al.*, (1969). Constituído por apenas quatro componentes SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 , hoje esta é a cerâmica de maior bioatividade conhecida (HENCH *et al.*, 1969; OMAR *et al.*, 2015; POLYMERIS *et al.*, 2017).

O biovidro 45S5 proporciona, depois de implantando, a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC), responsável em promover a ligação do implante com a estrutura óssea (HENCH, *et al.*, 1969; OMAR, *et al.*, 2015; POLYMERIS, *et al.*, 2017).

Essa interação biológica ocorre devido a uma sequência rápida de reações químicas na superfície dos vidros bioativos. Os estágios desta interação vidro bioativo/tecido consiste em uma rápida lixiviação dos íons para o meio corpóreo e, com isso, ocorre a formação de uma camada de sílica e, posteriormente, uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) na superfície do material. A formação da camada rica em sílica é um estágio fundamental para a ligação do vidro bioativo com o tecido ósseo, pois esta funciona como um material temporário para a precipitação de fosfatos de cálcio (hidroxiapatita carbonatada). Essa camada por sua vez, juntamente com as proteínas adsorvidas do meio, controla a formação de um novo tecido ósseo na superfície do biomaterial (SOUZA, 2015).

Neste contexto, esta pesquisa se propõe desenvolver um filme de MAP/TEOS, contendo partículas de biovidro, aplicado sobre uma liga metálica de titânio-alumínio-vanádio. O desenvolvimento desse sistema filme bioativo-substrato busca melhorar a resistência à corrosão e bioatividade do substrato e, conseqüentemente, aumentar o índice de sucesso clínico do mesmo quando aplicado em implantes metálicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os principais materiais utilizados neste trabalho foram: liga metálica de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V), filme de organossilano e partículas de biovidro. Foram utilizados diferentes reagentes químicos para a obtenção dos filmes e do fluido corpóreo simulado, e nas técnicas de caracterização.

Foi utilizada a liga de titânio-alumínio-vanádio, Ti-6Al-4V, como substrato, fornecida pela empresa Ti-Brasil Ltda. na forma de chapa laminada, com espessura de 0,15 mm. Para obtenção de corpos de prova, as chapas foram cortadas nas dimensões de 20 mm x 20 mm, com o auxílio de uma tesoura de corte. As amostras foram estudadas com duas topografias, como recebido e com as superfícies lixadas, como descrito mais adiante. Conforme certificado do fornecedor, a liga Ti-6Al-4V apresenta as especificações químicas requeridas pela norma ASTM F1472-14 (Tabela 2).

Tabela 2. Composição química da liga Ti-6Al-4V fornecida pela empresa Ti-Brasil Ltda.

Elemento químico	Concentração requerida (% em massa)
Alumínio	5,50-6,75
Vanádio	3,50-4,50
Carbono	< 0,08
Ferro	< 0,30
Oxigênio	< 0,20
Nitrogênio	< 0,05
Hidrogênio	< 0,015
Titânio	88,10-90,35

O material bioativo Biovidro F18 foi desenvolvido e fornecido pelo Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O F18, em pó, é composto por quantidades adequadas dos seguintes reagentes de pureza analítica: Na₂CO₃, K₂CO₃, K₂HPO₄, Na₂HPO₄, MgO, CaCO₃, SiO₂, Al₂O₃, ZnO, SrCO₃ e B₂O₃ e apresenta

coloração branca com diâmetro de partícula em torno de 0,05 μm (50 nm) (SOUZA *et al.*, 2013; SOUZA, 2015).

Os filmes aplicados sobre os substratos metálicos foram compostos pelos alcóxidos (trimetóxisililpropil)metracrilato (MAP) e tetraetoxisilano (TEOS), sem e com adição de partículas de Biovidro F18.

Para este estudo, foi adotada a seguinte nomenclatura para os filmes aplicados sobre o substrato não lixado e lixado:

- sistema substrato-MAP/TEOS: filme composto pelos alcóxidos MAP e TEOS;
- sistema substrato-MAP/TEOS/F18: filme composto pelos alcóxidos MAP e TEOS com a incorporação de Biovidro F18.

A codificação e a descrição das amostras do estudo estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Codificação e descrição das amostras do estudo.

Amostra	Descrição
LTi-SLix	Ti-6Al-4V sem lixamento e sem filme.
LTi-Lix	Ti-6Al-4V lixada e sem filme.
LTi-SLix-Sol	Ti-6Al-4V sem lixamento, com filme MAP/TEOS.
LTi-Lix-Sol	Ti-6Al-4V lixada com filme MAP/TEOS.
LTi-SLix-Sol-F18	Ti-6Al-4V sem lixamento, com filme MAP/TEOS/F18.
LTi-Lix-Sol-F18	Ti-6Al-4V lixada com filme MAP/TEOS/F18.

A Tabela 3 apresenta as informações técnicas dos reagentes utilizados no trabalho para a limpeza e ativação da superfície dos substratos e para a preparação dos filmes.

Para a simulação do fluido corpóreo, uma vez que todas as análises deste estudo ocorreram *in vitro*, foi utilizado como eletrólito uma solução de fluido corporal simulado - SBF (*simulated body fluid*), comumente utilizada em outros estudos *in vitro* (MURUGAN *et al.*, 2015).

A SBF foi preparada de acordo com o protocolo sugerido por Kokubo e Takadama (2006), cuja metodologia está descrita no Apêndice A.

Tabela 4 apresenta os reagentes que foram utilizados para preparar 1 L de SBF, as quantidades utilizadas e a ordem em que foram dissolvidos em água destilada.

Tabela 3. Informações técnicas dos reagentes utilizados.

Reagente	Sigla	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Pureza (%)	Marca
Extran® MA 02	Detergente Neutro	-	-	Merck S.A.
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07	99,5	Vetec
Acetona	C ₃ H ₆ O	58,08	99,8	Vetec
Hidróxido de Sódio	NaOH	40,00	98,3	Neon
Tetraetóxisilano	TEOS	208,33	99,0	Sigma-Aldrich
3(trimetóxisililpropil) Metacrilato	MAP	248,35	>98,0	Sigma-Aldrich
Ácido Acético	CH ₃ COOH	60,05	99,8	Neon
Biovidro	F18	-	99,9	LaMaV

Tabela 4. Reagentes e suas quantidades necessárias para preparação de 1 L de SBF.

Ordem	Reagente	Fórmula Química	Quantidade	Pureza (%)
1	cloreto de sódio	NaCl	8,035 g	99,5
2	bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	0,355 g	99,5
3	cloreto de potássio	KCl	0,225 g	99,5
4	fosfato de potássio dibásico trihidratado	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,231 g	99,0
5	cloreto de magnésio hexahidratado	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311 g	98,0
6	ácido clorídrico	HCl (1,0 mol/L)	39 mL	99,0
7	cloreto de cálcio	CaCl ₂	0,292 g	95,0
8	sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	0,072 g	99,0
9	tris(hidroximetil)aminometano	(OHCH ₂) ₃ CNH ₂	6,118 g	99,0
10	ácido clorídrico	HCl (1,0 mol/L)	0-5 mL	99,0

4.2 MÉTODOS

A Figura 7 mostra a sequência das etapas metodológicas desenvolvidas neste trabalho.

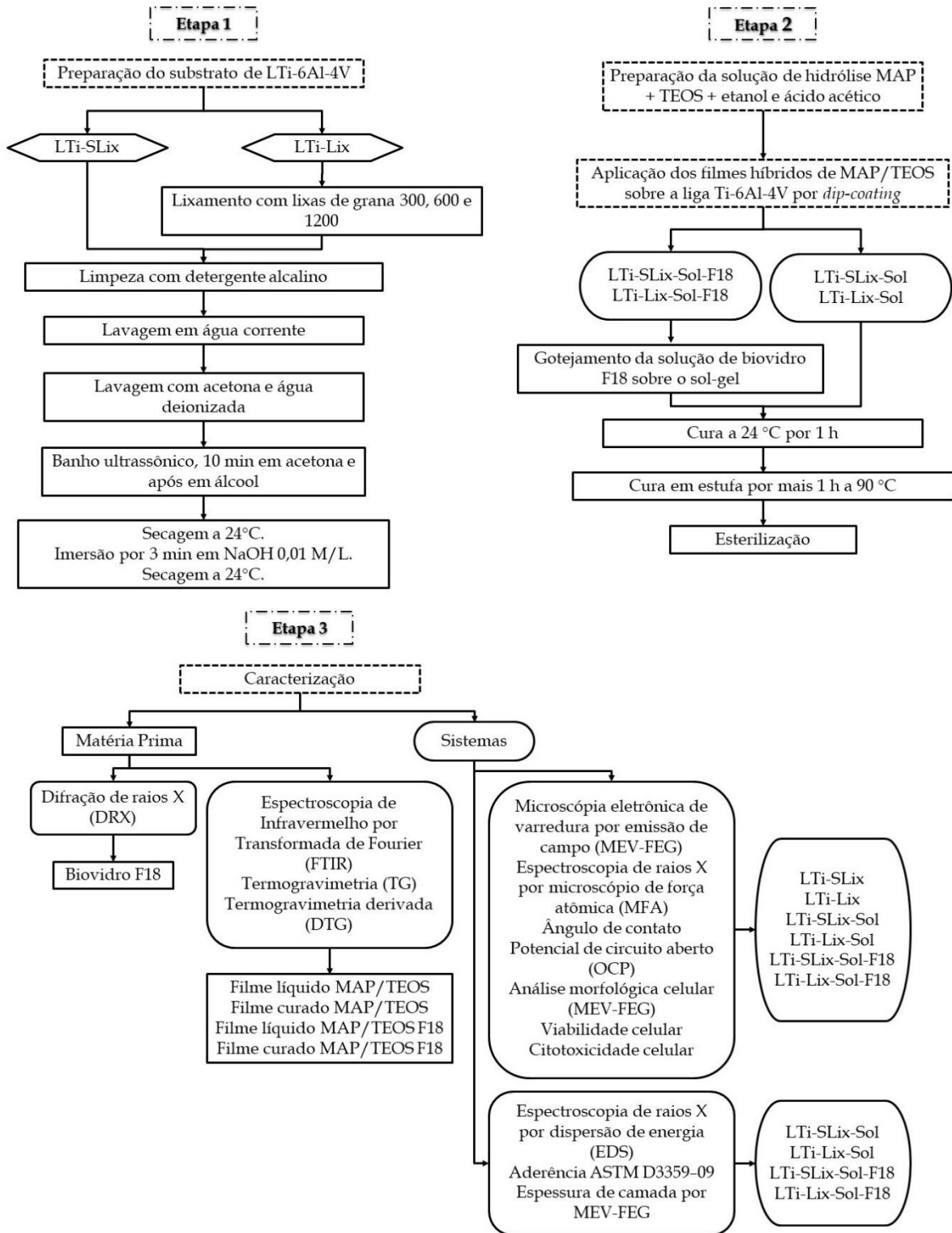


Figura 7. Fluxograma das etapas desta pesquisa.

A Etapa 1 se refere à preparação dos substratos metálicos, que consistiu no pré-tratamento da superfície (lixamento), limpeza e secagem. A Etapa 2, se refere à preparação e aplicação do filme, da cura do filme e da esterilização dos substratos e dos sistemas filme-substrato. Por fim, a Etapa 3, correspondeu à caracterização morfológica, física, química, térmica, mecânica, eletroquímica e biológica dos substratos, dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18, do Biovidro F18 e dos sistemas substrato-MAP/TEOS e substrato-MAP/TEOS/F18.

4.2.1 Preparação dos substratos - Etapa 1

Para analisar a influência da rugosidade superficial na aderência do filme de organossilano e na bioatividade, os substratos foram divididos em dois grupos, os lixados (LTi-Lix) e não lixados (LTi-SLix). As chapas de Ti-6Al-4V pertencentes ao grupo lixado foram lixadas manualmente com lixas de carbeto de silício de grana 300, 600 e 1200, nessa sequência.

Todos os substratos metálicos foram lavados com detergente alcalino Extran® MA 02 e, posteriormente, lavados com água corrente para eliminar qualquer resíduo. Na sequência, foram lavados com acetona, enxaguados com água deionizada e imersos em banho ultrassônico em acetona e álcool etílico durante 10 min em cada solvente (BALLARRE *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013; SALVADOR *et al.*, 2017). Posterior à limpeza, os substratos foram submetidos ao tratamento alcalino em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01 mol.L⁻¹ (pH = 11,5) por 3 min a temperatura de 24°C, para promover pontos de ancoragem do filme e auxiliar na reticulação do mesmo. Após a imersão, as amostras foram lavadas com água destilada e secas ao ar frio (CAPIOTTO, 2006; SALVADOR *et al.*, 2017).

4.2.2 Preparação e aplicação dos filmes - Etapa 2

O filme utilizado foi obtido por meio do processo sol-gel a partir das reações de hidrólise dos alcóxidos TEOS e MAP, nas proporções volumétricas (% em volume) definidas com base na literatura de TEOS:sol (1:10); MAP:sol (1,5:10); água:sol (1,5:10); etanol:sol (6:10) (CERTHOUX *et al.*, 2012; SAKAI *et al.*, 2012).

O sol foi preparado, inicialmente pela mistura do etanol com os alcóxidos a temperatura de 24°C, sob agitação magnética. Posteriormente, foi adicionada gradativamente água destilada, previamente acidificada com ácido acético, a fim de ajustar o valor do pH em 4 (OOIJ *et al.*, 2005; CARDOSO, 2015; SALVADOR *et al.*, 2018).

A mistura foi mantida sob agitação magnética constante por 10 min até obtenção de um sol transparente e límpido. Posteriormente, foi conduzido o processo de hidrólise (fase gel) à temperatura de 24°C durante 24 h sem agitação. Após a hidrólise, foi realizada a aplicação do sol-gel sobre os substratos de Ti-6Al-4V lixados e não lixados (KUNST *et al.*, 2013).

Para a aplicação do sol-gel na superfície metálica foi utilizado o método de *dip-coating* com velocidade de imersão e emersão de 10 cm.min⁻¹, com tempo de permanência na solução de aproximadamente de 5 min (KUNST *et al.*, 2015; SALVADOR *et al.*, 2017). Após a retirada das amostras do sol-gel, as mesmas foram expostas ao ar por um período de 1 h à 24°C, para condensação e evaporação dos solventes. Com o objetivo de atingir uma melhor e mais rápida reticulação da camada de organossilano, o metal revestido foi curado em estufa durante 1 h a 90°C (SAKAI *et al.*, 2012; CERTHOUX *et al.*, 2012; SALVADOR *et al.*, 2017; SALVADOR *et al.*, 2018).

Para a bioativação da superfície das amostras, o Biovidro F18 foi incorporado no filme de silano entre a secagem a temperatura de 24°C e a cura na estufa a 90°C. Para a realização dessa etapa, adotou-se a relação proposta por Jones (2001 e 2002), que sugere a imersão de 0,05 g de material em 50 mL de solução de SBF.

Para este estudo, foi realizada uma dissociação do Biovidro F18 em etanol na concentração de 0,001 g.mL⁻¹, conforme recomendações da norma ISO 10993-14. Essa dissociação é realizada em etanol, pois quando realizada na solução SBF, pode ocorrer a lixiviação dos íons Ca, Na, K e outros, devido à elevada solubilidade do Biovidro F18 no fluido corpóreo.

A suspensão de Biovidro F18 e etanol foi preparada e mantida sob agitação para evitar a sedimentação do biovidro. Em seguida, a mesma foi gotejada sobre uma das faces da superfície revestida com o auxílio de uma pipeta de Pauster. Posteriormente, os sistemas substrato-MAP/TEOS/F18 foram encaminhados para a cura (SAKAI *et al.*, 2012; CERTHOUX *et al.*, 2012).

Segundo o LaMaV, fornecedor do Biovidro F18, esse biovidro apresenta alta bioatividade e, portanto, não há necessidade de o mesmo estar em toda a superfície do implante, uma vez que pode ocorrer a morte celular por excesso de substrato. Os pesquisadores indicam recobrir a superfície do implante de forma a produzir “ilhas” de Biovidro, recobrando em torno de 10% do total da superfície (SOUZA *et al.*, 2013; SOUZA, 2015; ZANOTTO; PEITL; CHINAGLIA, 2015).

Após a preparação de todos os sistemas, as amostras foram esterilizadas, passando, inicialmente, pelo processo de limpeza por imersão durante 10 min em uma solução de detergente enzimático ENZI-TEC 5, diluído em 2 mL. Em seguida, as amostras foram enxaguadas com água de osmose inversa e secas com ar comprimido filtrado. Ao término da etapa de limpeza, as amostras foram encaminhadas para a área de preparo onde foram embaladas individualmente, em grau cirúrgico 100 cmX150 cm, com integrador químico para esterilização por óxido de etileno (ETO). A esterilização das amostras foi realizada pela empresa Esterilizare Esterilização de Produtos Ltda. e seguiu o protocolo de esterilização em óxido de etileno, de acordo com as instruções da Portaria Interministerial N^o. 482 de 16 de abril de 1999 (ANVISA, 2010; SAVARIS *et al.*, 2016). As condições do processo de esterilização em óxido de etileno foram: pressão: 0.68 kgf.cm⁻²; temperatura: 54,5°C; tempo: 320 min.

4.2.3 Ensaios de caracterização - Etapa 3

4.2.3.1 Caracterização das partículas de Biovidro F18 e dos filmes

A composição química do Biovidro F18 foi determinada por Difração de Raios X (DRX) utilizando um difratômetro Shimadzu-XRD 6000 (Japão) com ângulo de difração (2θ), no intervalo de 20 a 85°, passo 0,05° e tempo de integração de 1 s (VARIOLA *et al.*, 2008), operado com uma tensão de 40 kV, corrente de 40 mA e utilizando a radiação $K\alpha Cu = 1,54178 \text{ \AA}$. Essa análise foi realizada no Laboratório Central de Microscopia (LCMIC) da Universidade de Caxias do Sul (UCS). A identificação das fases presente no material foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas cristalográficas padrões da base de dados do programa X'pert Highscore plus - PDF-2.

As propriedades térmicas dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 curados a 90°C foram estudadas por termogravimétrica (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG). Essas análises foram realizadas em um equipamento da marca Shimadzu (Japão), modelo TGA-50, com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ em atmosfera inerte de N₂ (50 mL.min⁻¹), na faixa de temperaturas de 10 a 800°C. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Polímeros (LPOL) da UCS.

Os filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18, curados a 90°C, também foram avaliados por Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR) em um espectrômetro Nicolet IS10, Thermo Scientific (USA) para a identificação dos grupos funcionais e das ligações presentes. Essa análise foi realizada na região compreendida entre 4000 a 450 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹. As amostras foram preparadas pelo método de pastilha de brometo de potássio (KBr). As análises foram realizadas no LPOL da UCS.

4.2.3.2 Caracterização dos substratos e dos sistemas substratos-filme







Todas as amostras indicadas no Quadro 1 foram avaliadas quanto a sua morfologia por meio de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG), em um microscópio marca Tescan, modelo Mira3 (República Checa) instalado no LCMIC da UCS. As amostras foram observadas em vista de topo.

A topografia (perfil e rugosidade da superfície) dos substratos e dos sistemas substrato-filme foi determinada por Microscopia de Força Atômica (MFA) em um equipamento da marca SHIMADZU, modelo SPM-9500J3 (Japão) instalado no LCMIC da UCS. As análises foram realizadas em modo sem contato, com sondas de nitreto de silício (nanossensores) e scanner com variação vertical de 8 µm e área de varredura de 10 µm × 10 µm. Foram avaliados os parâmetros de rugosidade média aritmética Ra, rugosidade média quadrática Rq, rugosidade média Rz e rugosidade total Rt (GADELMAWLA *et al.*, 2002).

A espessura dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 foram determinadas por MEV-FEG. As amostras foram posicionadas no microscópio em um ângulo de inclinação de 35°, a fim de estimar a espessura dos filmes formados sobre os substratos metálicos. A análise foi realizada no LCMIC da UCS.

A aderência dos filmes aos substratos foi avaliada utilizando fita tape, segundo a norma ASTM D3359-09 (2010), que sugere a realização de 7 riscos paralelos e 7 riscos perpendiculares, formando 100 quadrados de 1 mm × 1 mm. Em seguida, a fita tape (3M) foi aplicada e pressionada no local dos cortes e, após 3 min, a mesma foi removida em direção paralela à superfície da amostra. A ocorrência de deslocamento foi analisada por MEV-FEG e comparada com o critério de avaliação da norma ASTM D3359-09, representada no Quadro 2 adaptada da norma ASTM D3359-09 pela alteração da fonte. Além disso, os sistemas substrato-filme foram avaliados por Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS), utilizando um detector acoplado ao MEV-FEG do LCMIC da UCS. Essa técnica foi utilizada com o intuito de verificar a presença dos elementos químicos e, conseqüentemente, a presença do filme de organossilano e seu nível de aderência ao substrato.

Quadro 2. Critérios de avaliação da aderência para os sistemas substrato-filme. Adaptado de ASTM D3359-09 (2010).

Classificação	Porcentagem de área removida (%)	Aspecto da amostra após teste
5B	0	
4B	Menos que 5	
3B	5-15	
2B	15-35	
1B	36-65	
0B	Mais que 65	

O ângulo de contato dos substratos metálicos e dos sistemas substrato-filme foi determinado pelo método da gota séssil no Laboratório de Corrosão e Proteção Superficial (LCOR) da UCS. Uma gota de SBF foi depositada sobre a superfície com o auxílio de uma seringa B-D Yale 3D. O volume médio da gota de SBF depositada foi de 0,05 mL. O ângulo formado foi observado por meio de fotografias com lente de baixo aumento. O ensaio foi realizado em triplicata e a aquisição e tratamento dos dados foi feita usando o Software SurfTens 4.5.

A resistência à corrosão dos substratos e dos sistemas substrato-filme foi avaliada pelo Potencial de Circuito Aberto (OCP). Esse ensaio eletroquímico foi realizado no potenciostato/galvanostato IviumStat da Ivium Technologies (Holanda), com o auxílio de software IviumSoft. Para a execução da análise, foi utilizada uma célula convencional de três eletrodos: a amostra, o eletrodo de referência de calomelano saturado (ECS) e o contra-eletrodo de platina. A medida foi realizada sem agitação, em meio naturalmente aerado e à temperatura de 24°C. O eletrólito utilizado foi o fluido corporal sintético com 6,5 g.L⁻¹ de NaCl. O potencial de circuito aberto foi monitorado durante a primeira hora de imersão no eletrólito. O intervalo de varredura foi de 200 mV abaixo do potencial de circuito aberto e 600 mV acima desse potencial, com velocidade de varredura de 1 mV.s⁻¹.

A análise biológica dos substratos metálicos e dos sistemas substrato-filme foi realizada por meio da avaliação morfológica, viabilidade celular e citotoxicidade. Para os ensaios biológicos foram utilizadas as células tumorais de osteosarcoma (MG-63) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (P/S). As células foram mantidas em garrafas para cultura de tecido em estufa a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Previamente aos plaqueamentos, as células foram lavadas com tampão PBS e soltas da garrafa com solução de tripsina, a qual foi inativada pela adição de meio suplementado. As células também foram certificadas quanto a ausência de micoplasma durante todos os ensaios (DENIZOLT; LANG, 1986).

Para a avaliação morfológica das células viáveis aderidas às superfícies dos substratos e sistemas substrato-filmes, inicialmente, cada amostra foi colocada em um poço em placa de 6 poços. Posteriormente, as células MG-63 foram semeadas sobre as amostras a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹ para as análises de 1, 4 e 7 dias. Em ambas as linhagens, foram utilizados 2000 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S sobre as amostras durante 1, 4 e 7 dias. Para o controle negativo, foi empregado o meio DMEM (10% de SFB e 1% P/S), e para o controle positivo, 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi incubado a 37°C em 5% de CO₂, no mesmo tempo citado anteriormente. Posteriormente, as células foram fixadas com

solução de glutaraldeído 3% em PBS (v/v) durante 15 min e com etanol 30, 50, 70, 90 e 100% (v/v) durante 10 min para cada concentração para permitir seu manuseio no interior do microscópio eletrônico. Em seguida, as amostras foram mantidas em dessecador até a realização da análise. As amostras foram recobertas com ouro em equipamento de *sputtering* e observadas por MEV-FEG no LCMIC da UCS, em modo de alto vácuo com tensão máxima do feixe em 15 kV, para não danificar as células fixadas.

A viabilidade celular das amostras foi avaliada pelo método indireto do ensaio de redução celular por brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Esse método é baseado na redução do MTT pela enzima desidrogenase mitocondrial, na formação de cristais de formazan (DENIZOLT; LANG, 1986). As células MG-63 foram semeadas a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células mL⁻¹ em 100 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S. Após 24 h, as células foram tratadas com a solução de extração das amostras durante 1, 4 e 7 dias. Para o controle negativo, foi utilizado o meio DMEM (10% de SFB e 1% P/S), e para o controle positivo, o DMSO 5%. As amostras foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂, no mesmo tempo citado acima. O meio foi removido e 1 mg.mL⁻¹ de MTT em meio isento de SFB e P/S foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas a 37°C durante 2h em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Subsequentemente, foi retirada a solução de MTT e dissolvidos os cristais de formazan em 100 µL de DMSO. Foi realizada a leitura espectrofotométrica a 570 nm em um leitor de microplacas (espectros Max190, Molecular Devices, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade. A absorbância do controle negativo representa 100% de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculados como porcentagem do controle. As alterações na viabilidade celular analisadas pelo método indireto foram observadas e documentadas, após 1, 4 e 7 dias de exposição ao tratamento da amostra. O grupo de controle negativo foi tratado com meio DMEM.

A citotoxicidade dos substratos e dos sistemas substrato-filme foi analisada pelo método direto com a técnica de coloração usando laranja de acridina e brometo de etídio em placas de 6 poços. Amostras (4 cm²) foram dispostas em poços individuais, sobre as quais foram semeadas as células MG-63 com densidade de $1,5 \times 10^5$

células/poço em 2000 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S. Subsequentemente, as amostras foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante o período de 1, 4 e 7 dias. Posteriormente, o meio de cultura foi removido, lavado com *Phosphate-buffered saline* (PBS), e sobre as amostras foi aplicada a técnica de coloração com corante laranja de acridina (100 µg.mL⁻¹) e brometo de etídio (100µg.mL⁻¹). Foi realizada a contagem de células em apoptose por microscópio de fluorescência com 100× de magnificação.

A significância estatística dos resultados de viabilidade celular e citotoxicidade foi avaliada utilizando o teste *t* e análise de sentido único de variância (ANOVA) com o teste de comparação de múltiplas médias (Tukey) para avaliar as diferenças estatísticas no caso da distribuição normal. A significância estatística será aceita para *p* inferior a 0,05. Nessa análise foi utilizado o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versão 19.0) para Windows.

Os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular foram realizados no Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA da UCS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A etapa 3, referente a caracterização das amostras iniciou com a análise e a discussão dos resultados de DRX, TG/DTG e FTIR que envolveram a avaliação da influência da adição do Biovidro F18 na degradação e na composição química dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18. A análise e a discussão dos resultados da caracterização (MEV-FEG, EDS, AFM, aderência, espessura de camada, ângulo de contato e OCP) relativas aos substratos e aos sistemas substratos-filmes se concentraram na avaliação da influência da rugosidade do substrato e da adição do Biovidro F18 no filme MAP/TEOS na morfologia, aderência, espessura de camada, molhabilidade e resistência à corrosão do substrato e sistemas substrato-filme. A biocompatibilidade das superfícies dos substratos e dos sistemas com os filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 foi avaliada considerando a aderência, a proliferação e a morfologia das células viáveis.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS BIOVIDRO F18 E DOS FILMES

5.1.1 Composição química das partículas de Biovidro F18

O difratograma do Biovidro F18 está apresentado na Figura 8. Os picos de difração identificados coincidem com o mineral de silicato $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ (combeite), carta cristalográfica PDF # 22.1455, ambos na localização angular e intensidade relativa, em concordância com estudos da literatura (CHEN; THOMPSON; BOCCACCINI, 2006; ADAMS, *et al.*, 2017).

O mineral de silicato $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ no Biovidro F18, também está presente no Biovidro 45S5, que ainda é o vidro de maior bioatividade conhecida e, portanto, apresenta forte ligação com o tecido ósseo. Assim, pode-se inferir que o Biovidro F18 apresentaria reatividade com fluido corporal, a qual é responsável pelo mecanismo de ligação e bioatividade (CHEN; THOMPSON; BOCCACCINI, 2006).

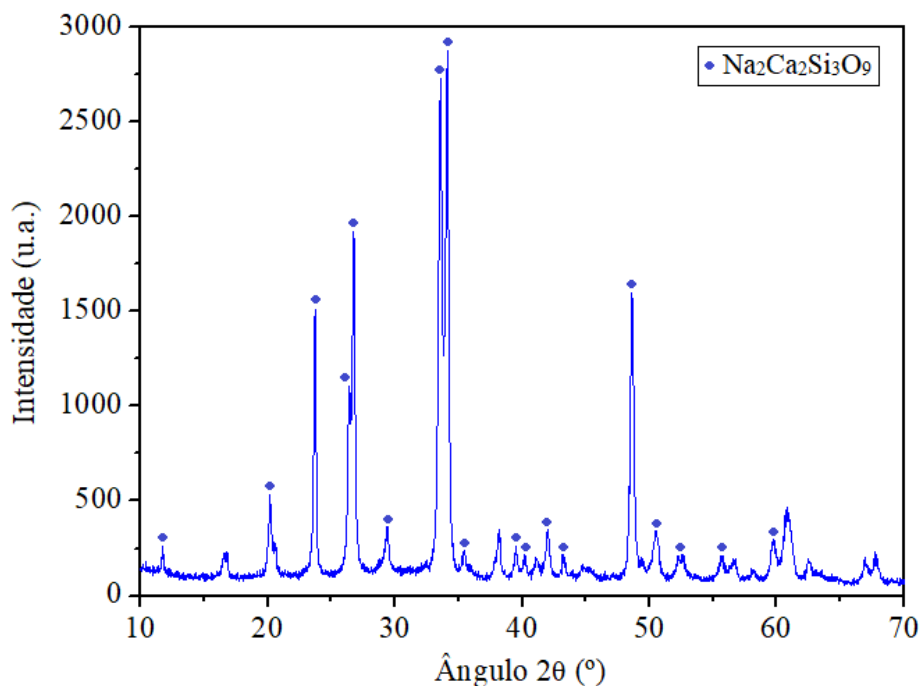


Figura 8. Difratoograma das partículas de Biovidro F18.

5.1.2 Propriedades térmicas dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18

A Figura 9 apresenta os termogramas obtidos por TG para os filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18, curados a 90°C. Os filmes apresentaram comportamento semelhante em relação a perda de massa, indicando que o Biovidro F18 não influenciou no comportamento térmico do filme MAP/TEOS, sendo que a massa residual observada para os filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 foi de aproximadamente 53,6 e 56,2% respectivamente, sendo essas massas residuais correspondente a rede siloxano (Si-O-Si) e a rede siloxano com o Biovidro F18. A perda de massa ocorreu de forma gradual e uniforme o que caracteriza a decomposição dos componentes orgânicos da estrutura molecular do filme, ou seja, a parte polimérica (YEH, *et al.*, 2006; BALLARRE, *et al.*, 2008).

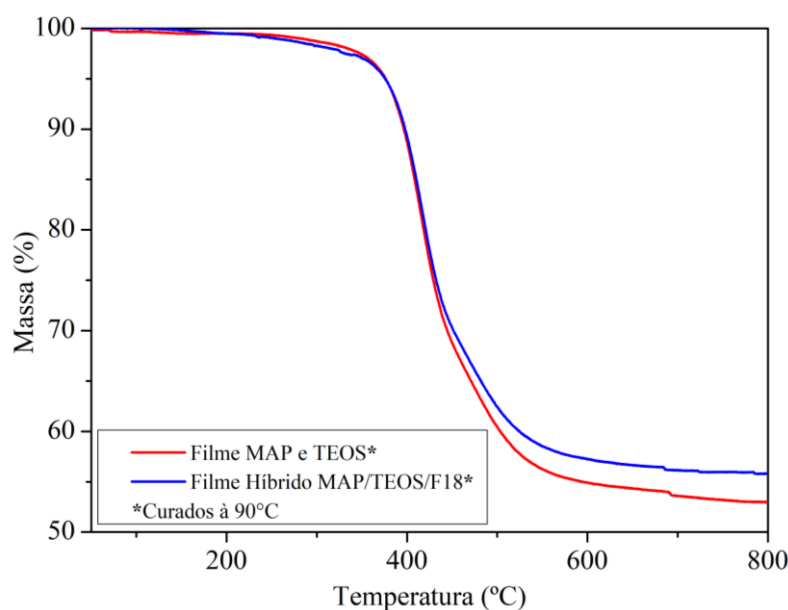
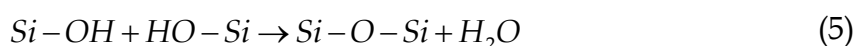


Figura 9. Curva TG dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18.

Com o auxílio dos termogramas obtidos por DTG (Figura 10) foi possível identificar três eventos de perda de massa dos filmes, sendo a primeira etapa entre 209°C a 311°C, a segunda com início em 335°C e término em 459°C e o terceiro *range* de degradação ocorreu entre 459°C à 600°C. A temperatura máxima de degradação do filme foi de aproximadamente 416°C.

O primeiro evento pode estar relacionado com a liberação da água estrutural fortemente ligada à rede vítrea, sob a forma de grupos silanóis, apresentado na Equação (5) (MOZAFARI, *et al.*, NAYAK, *et al.*, 2010; 2010; MA, *et al.*, 2011; CATTEAUX, *et al.*, 2013). O segundo evento correspondeu a degradação da cadeia polimérica e a terceira etapa de degradação, superior a 459°C, pode ser atribuída à degradação dos grupos siloxanos (YEH, *et al.*, 2006; BALLARRE, *et al.*, 2008).



A ausência de inflexões nas curvas DTGs entre 100 e 200°C indica que o processo de desidratação e evaporação do etanol e da água, retidos na estrutura do filme durante a formação do sol, ocorreu durante a cura a 90°C.

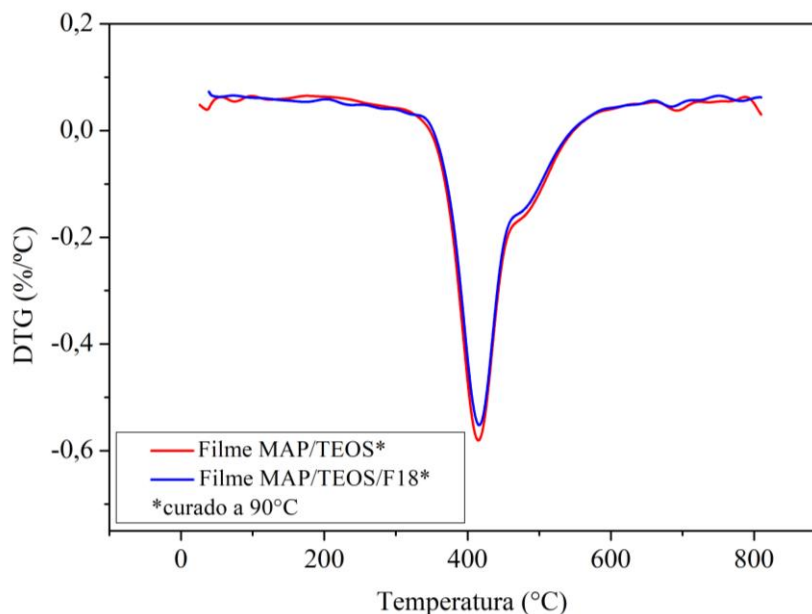


Figura 10. Curva DTG dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 curados a 90°C.

5.1.3 Caracterização da estrutural dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18

A Tabela 5 relaciona as bandas de absorção observadas de cada grupo funcional, Figura 11, numeradas de 1 a 8. A Figura 11 apresenta os espectros de infravermelho obtidos dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18, nas formas curado e não curado.

Tabela 5. Bandas características dos comprimentos de onda pela análise de FTIR.

Identificação Numérica	Posição da Banda (cm ⁻¹)	Atribuição da Banda
1	3200-3700	Estiramento do grupo OH do Si-OH
2	2900-3000	Estiramento -CH (CH ₂ e CH ₃)
3	1700-1750	Estiramento C=O (ácido acético)
4	1600-1670	Estiramento de C=C-H
5	1300-1400	*Dobramento CH ₂ e CH ₃
6	1000-1200	Estiramento Si-O das ligações Si-O-Si reticulada
7	900-960	Estiramento simétrico Si-O-C ₂ H ₅ dos grupos não hidrolisados
8	800-890	Estiramento Si-O (Si-OH)
8	600-800	Estiramento -CH (Si-CH ₂ -CH ₂ -Si)

Fonte: Romano *et al.*, (2011); *Pavia, *et al.*, (2011).

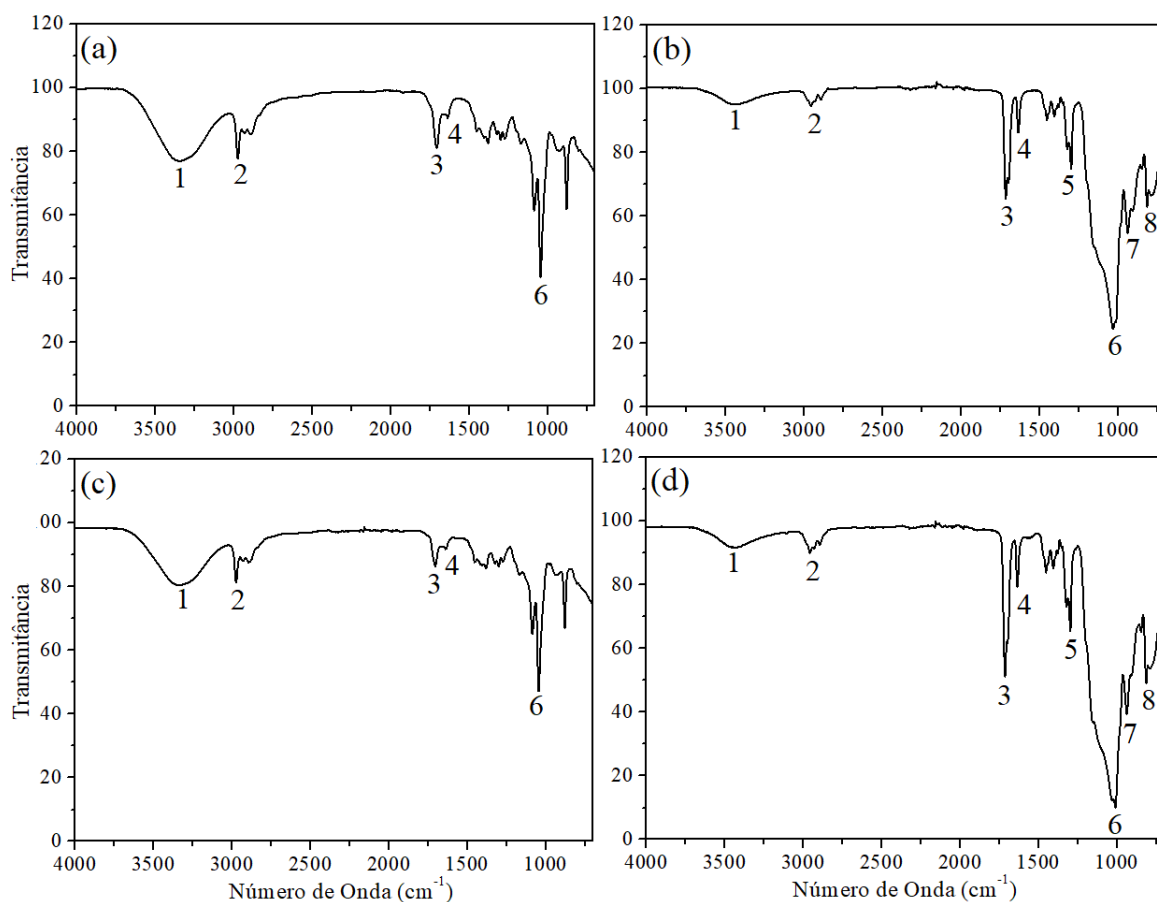


Figura 11. FTIR de (a) Filme MAP/TEOS líquido; (b) Filme MAP/TEOS curado a 90°C; (c) Filme MAP/TEOS/F18 líquido e (d) Filme MAP/TEOS/F18 curado a 90°C.

Na Figura 11, foi observado que todos os filmes apresentaram bandas de absorção coincidentes na mesma faixa de número de onda, ou seja, os filmes apresentam os mesmos agrupamentos funcionais, entretanto intensidades diferentes. Também pode-se visualizar uma larga banda de absorção em 3445 cm^{-1} (1), referente ao grupo -OH, derivado do grupo silanol (Si-OH) não condensados durante a cura do filme MAP/TEOS. As bandas em 3000 cm^{-1} (2) e 1400 cm^{-1} (5) referem-se, respectivamente, ao estiramento assimétrico e ao deformação no plano das ligações do -CH (CH₂ e CH₃) atribuídos à cadeia do alcóxi-silano MAP (PAVIA, *et al.*, 2011). A banda em 1730 cm^{-1} (3) representa o grupo funcional C=O proveniente do ácido acético utilizado para corrigir o pH do sol até 4. A banda entre 1130 e 1043 cm^{-1} (6) são designadas às ligações Si-O-Si. O estiramento assimétrico dos grupos Si-OH, Si-C e C-Si-O correspondem às bandas 966 (7), 766 e 444 cm^{-1} (8), respectivamente.

Entre os resultados obtidos, a banda de absorção do grupo -OH e Si-O-Si foram fundamentais para a caracterização do filme MAP/TEOS após a cura. A banda de absorção (1), referente ao grupo funcional -OH, apresentou maior intensidade nos filmes não curados, o que confirmou que esses filmes ainda não passaram pela etapa de condensação. Após a cura, foi possível observar que a intensidade da banda de absorção (1) foi maior no filme com Biovidro F18, em relação ao filme sem Biovidro F18. A maior concentração de -OH na estrutura do filme curado com Biovidro F18 indicou que o processo de condensação e, portanto, a reticulação ocorreu de forma incompleta, o que sugeriu um filme com menor estabilidade e menor função barreira (OOIJ *et al.*, 2005; LIANG; HU; WU, 2014).

Em contraste com o observado na banda de absorção do grupo -OH, a maior intensidade da banda Si-O-Si, nos filmes curados, indicou que o filme foi reticulado, pois este grupo funcional é responsável pela formação da rede siloxano. Conforme a literatura a intensidade da banda Si-O-Si influencia proporcionalmente nas características do filme, como densidade e impermeabilidade, sendo assim, quanto maior a intensidade da banda (6) (Tabela 5), mais denso e impermeável será o filme (GRAEVE *et al.*, 2007; LIANG; HU; WU, 2014).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E DOS SISTEMAS SUBSTRATO-FILME

5.2.1 Morfologia das superfícies - substratos e sistemas substrato-filme

A Figura 12 apresenta as micrografias obtidas por MEV-FEG para os substratos sem e com lixamento e para os sistemas substrato-filme MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18. Foi possível observar na Figura 12 (a) a presença de cavidades e fissuras na superfície do substrato Ti-6Al-4V sem lixamento, defeitos provavelmente provenientes do processo de conformação da chapa, que caracteriza essa superfície irregular (BINGJING *et al.*, 2016). Já a superfície do substrato metálico com lixamento, Figura 12 (b), apresentou sulcos longitudinais e paralelos entre si, na direção do lixamento, o que indicou uma superfície com rugosidade controlada e mais uniforme em relação à superfície não lixada.

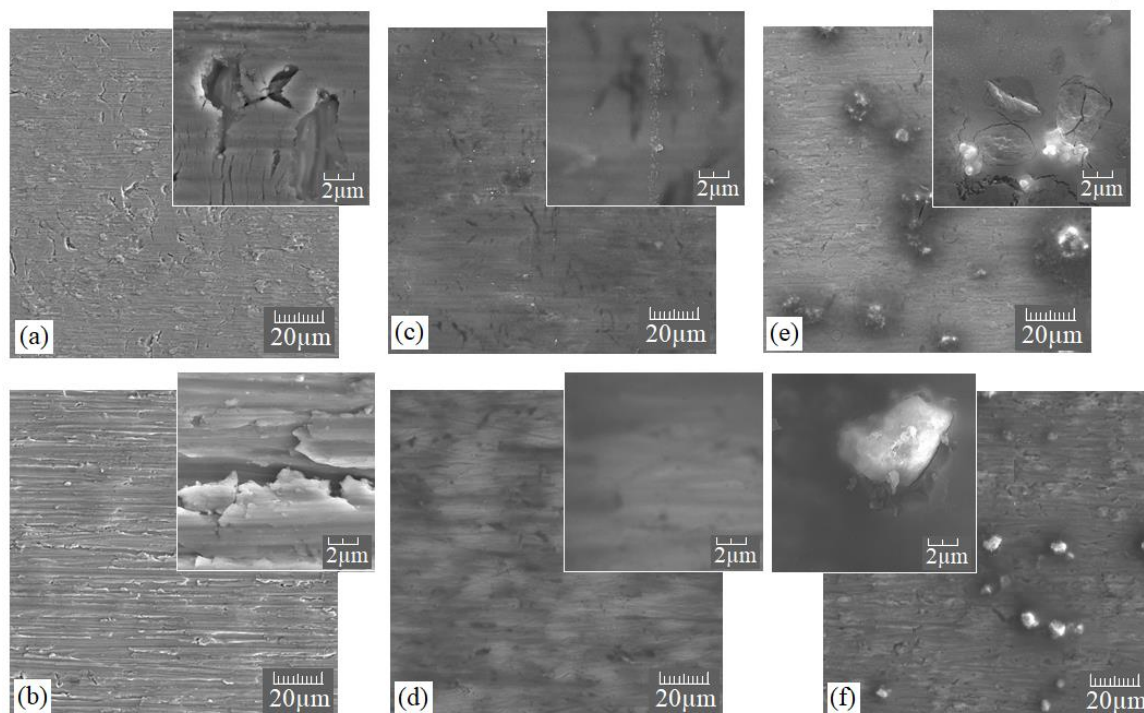


Figura 12. MEV-FEG para todas amostras; (a) LTi-SLix, (b) LTi-Lix, (c) LTi-SLix-Sol, (d) LTi-Lix-Sol, (e) LTi-SLix-Sol-F18, (f) LTi-Lix-Sol-F18.

Para os substratos revestidos (LTi-SLix-Sol e LTi-Lix-Sol), o filme MAP/TEOS depositado mostrou-se, aparentemente, fino, pois as fissuras e sulcos do substrato metálico podem ser ainda visualizados na Figura 12 (c) e (d). Além disso, foram observadas regiões claras e escuras que, segundo Salvador (2018), podem estar associadas às variações da espessura do filme, o qual é mais espesso nas regiões escuras e mais fino nas áreas claras. As regiões escuras do filme podem ser relacionadas com as cavidades e sulcos do substrato metálico, onde, provavelmente, houve maior acúmulo do filme (MOHAMMADLOOA *et al.*, 2012).

A Figura 12 (e) e a Figura 12 (f), apresentam as micrografias dos substratos revestidos com filme MAP/TEOS/F18, em que foi possível visualizar que as regiões mais escuras estão localizadas no perímetro das partículas de F18, provavelmente, devido à afinidade das partículas pelo filme, uma vez que o Biovidro F18 contém Si. No entanto, nas regiões escuras do filme depositado sobre o substrato sem lixamento (LTi-SLix-Sol-F18), Figura 12 (e), se observaram fissuras, que podem estar relacionadas com a ancoragem mecânica do filme sobre o substrato. Uma superfície com rugosidade controlada e uniforme propicia pontos de ancoragem, o que favorece a adesão do filme

ao substrato. Nesse sentido, em comparação ao sistema LTi-Lix-Sol-F18, o LTi-SLix-Sol-F18 apresentou uma superfície mais lisa, apresentando menos pontos de ancoragem, o que pode favorecer o surgimento de fissuras nas regiões onde o filme apresentou maior espessura (KURELLA; DAHOTR, 2005; QU *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018). Essas fissuras podem influenciar negativamente na proteção barreira do mesmo, criando caminhos preferenciais para a permeabilidade e acúmulo do eletrólito (MOHAMMADLOOA *et al.*, 2012).

5.2.2 Topografia das superfícies - substratos e sistemas substrato-filme

A Tabela 6 apresenta os valores de rugosidade Ra, Rq, Rz e Rt, e a Figura 13, as imagens de microscopia de força atômica para os substratos, sem e com lixamento, e para os sistemas substrato-filme MAP/TEOS e substrato-filme MAP/TEOS/F18.

Tabela 6. Parâmetros de rugosidade do ensaio de AFM para toas as condições estudadas.

Sistemas	Ra (nm)	Rq (nm)	Rz (nm)	Rt (nm)
LTi-SLix	7,60 ± 0,00	11,03 ± 0,03	180,94 ± 0,01	385,62 ± 0,03
LTi-Lix	14,07 ± 0,03	20,61 ± 0,5	303,68 ± 0,85	632,97 ± 0,54
LTi-SLix-Sol	10,12 ± 0,01	14,87 ± 0,02	277,76 ± 0,65	527,38 ± 0,35
LTi-Lix-Sol	11,30 ± 0,02	15,01 ± 0,04	419,22 ± 0,74	821,90 ± 0,45
LTi-SLix-Sol-F18	16,61 ± 0,03	26,48 ± 0,01	739,15 ± 0,79	1472,47 ± 0,58
LTi-Lix-Sol-F18	20,71 ± 0,04	31,78 ± 0,06	763,85 ± 0,76	1508,44 ± 0,62

Verificou-se que o processo de lixamento do substrato (LTi-Lix) conferiu uma rugosidade maior em relação ao processo sem lixamento (LTi-SLix), visto que, por exemplo, os valores de Ra aumentaram de 7,60 nm, para o substrato sem lixamento a 14,07 nm, para o substrato com lixamento (Tabela 6). A mesma tendência foi observada nos demais parâmetros de rugosidade, Rq, Rt e Rz. Esse resultado já era esperado, uma vez que, na análise de MEV-FEG, observou-se que a superfície da amostra SLix era mais lisa [Figura 12 (a)] em relação à da amostra Lix [Figura 12 (b)].

Os substratos revestidos com filme MAP/TEOS (LTi-SLix-Sol e LTi-Lix-Sol) apresentaram valores de rugosidade significativamente menores que os dos substratos

sem filme. Nesse caso, a rugosidade do filme sobre o substrato lixado foi maior que a do filme depositado sobre o substrato sem lixamento. Esse resultado mostra que a espessura do filme foi maior que as alturas das asperezas da superfície do substrato. Além disso, a rugosidade do filme foi influenciada pela rugosidade do substrato, uma vez que se manteve a tendência de ser maior a rugosidade do filme depositado sobre o substrato lixado. Esses valores estão de acordo com as imagens obtidas por MEV-FEG [Figura 12 (c) e (d)], as quais denotam uma superfície homogênea e sem fissuras. Sendo assim, o filme MAP/TEOS cobriu efetivamente a superfície da amostra.

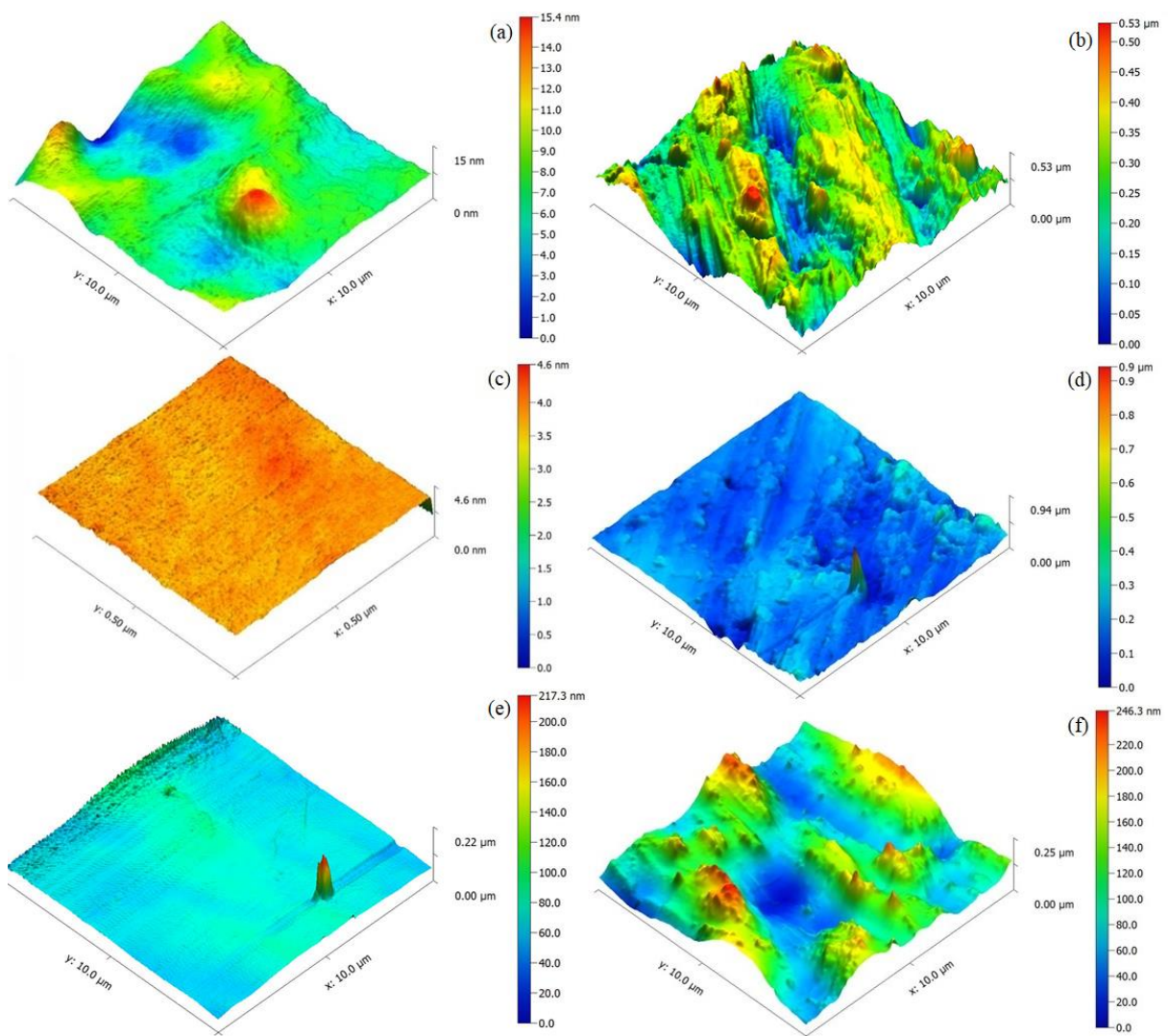


Figura 13. Micrografias de força atômica dos sistemas: (a) LTi-SLix, (b) LTi-Lix, (c) LTi-SLix-Sol, (d) LTi-Lix-Sol, (e) LTi-SLix-Sol-F18, (f) LTi-Lix-Sol-F18.

Similarmente, para os filmes com Biovidro F18 (LTi-SLix-Sol-F18 e LTi-Lix-Sol-F18), a rugosidade Ra aumentou de 16,61 nm para 20,71 nm, com a mudança do substrato de não lixado para lixado (Tabela 6). Verificou-se também, que as partículas de Biovidro F18 proporcionaram o aumento da rugosidade do filme MAP/TEOS/F18 depositado sobre ambos os substratos, lixado e não lixado, com um efeito maior para o substrato lixado. Esse aumento da rugosidade com a adição de partículas de Biovidro F18 se explica ao se observar as partículas expostas nas micrografias obtidas por MEV-FEG, [Figura 12 (e) e (f)].

Do ponto de vista biológico, estudos citam que a rugosidade é um fator determinante para a bioatividade, pois as células necessitam de pontos de ancoragem na superfície dos implantes para iniciar a sua proliferação (GUÉHENNEC, *et al.*, 2007; SLEPIČKA, *et al.*, 2017). Nos resultados obtidos, todas as amostras apresentaram valores para Ra em escala nanométrica, em um *range* de 7,60 nm até 20,71 nm. Conforme mencionado na seção 3.3.2, ainda não há uma topografia e rugosidade ideal para a viabilidade celular. Embora alguns estudos citam que protuberâncias na faixa de 10 a 350 nm e Ra entre 4 a 60 nm proporcionam sítios de biofixação adequados e, portanto, foram qualificados como possíveis ranges promissores para viabilidade celular, essas faixas de rugosidade ainda são consideradas variáveis (BIGGS, *et al.*, 2010; ZAREIDOOST, *et al.*, 2012; OLIVARES-NAVARRETE, *et al.*, 2015; HUANG, *et al.*, 2016). No entanto, a topografia deve apresentar uma rugosidade controlada pois, se a superfície apresentar picos muito altos ou vales muito profundos, as células poderão não encontrar sítios para biofixação (PRADO, *et al.*, 2015; HOTCHKISS, *et al.*, 2016).

5.2.3 Espessura dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 depositados sobre o substrato metálico lixado e não lixado

A Figura 14 apresenta as micrografias obtidas por MEV-FEG para estimar a espessura do filme dos sistemas substrato-filme (LTi-SLix-Sol e LTi-Lix-Sol) e substrato-filme-biovidro (LTi-SLix-Sol-F18 e LTi-Lix-Sol-F18). A Tabela 7, apresenta os valores dessas medições.

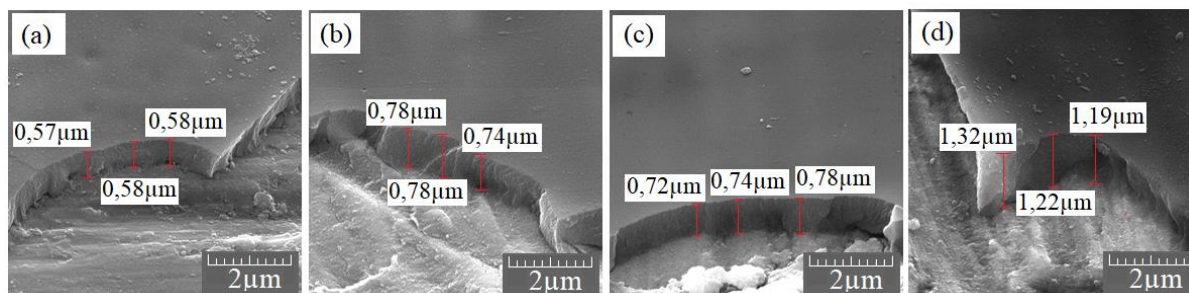


Figura 14. Micrografias obtidas por FEG para estimar a espessura do filme dos sistemas: (a) LTi-SLix-Sol, (b) LTi-Lix-Sol, (c) LTi-SLix-Sol-F18, (d) LTi-Lix-Sol-F18.

Tabela 7. Medidas de espessura para os sistemas substrato-filme MAP/TEOS e substrato-filme MAP/TEOS/F18

Sistemas	LTi-SLix-Sol	LTi-Lix-Sol	LTi-SLix-Sol-F18	LTi-Lix-Sol-F18
	0,57	0,78	0,72	1,32
Medidas (μm)	0,58	0,78	0,74	1,22
	0,58	0,74	0,78	1,19
Média (μm)	$0,58 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,03$	$1,24 \pm 0,18$

Pode-se observar que a espessura do filme MAP/TEOS depositado sobre o substrato não lixado (LTi-SLix-Sol) foi menor em relação à do filme depositado sobre o substrato lixado (LTi-Lix-Sol), o que pode estar relacionado com a maior rugosidade gerada no processo de lixamento do substrato, que, propiciou, provavelmente, uma maior área de contato entre substrato e filme.

Com a adição de partículas de Biovidro F18 (LTi-SLix-Sol-F18 e LTi-Lix-Sol-F18), foi observado o aumento da espessura, tanto para o filme depositado sobre o substrato sem lixamento quanto para o substrato com lixamento. Esse resultado já era esperado, uma vez que o FTIR (Figura 11) indicou a formação de um filme MAP/TEOS/F18 curado com menor reticulação, dada a maior intensidade da banda de absorção do -OH, quando comparado ao filme sem biovidro. Essa menor reticulação se reflete em uma menor compactação do filme e, conseqüentemente, em uma maior espessura (KREGIEL, 2014). Observou-se na Tabela 7 que o efeito da adição de Biovidro F18 no aumento da espessura do filme foi maior no filme depositado sobre o substrato lixado, que foi a mesma tendência observada nos valores de rugosidade (Tabela 6).

5.2.4 Aderência dos filmes aos substratos

A Figura 15 apresenta as micrografias obtidas por MEV-FEG, para o ensaio de aderência dos filmes (MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18) aos substratos não lixados e lixados.

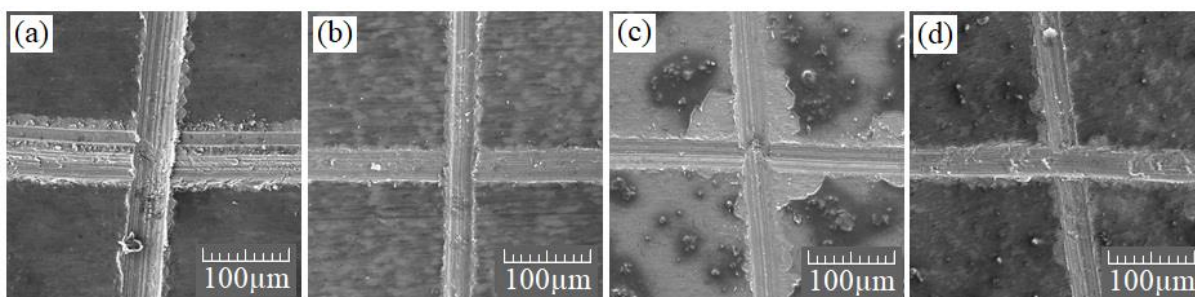


Figura 15. Micrografias do teste de aderência dos sistemas substrato-filme: (a) LTi-SLix-Sol, (b) LTi-Lix-Sol, (c) LTi-SLix-Sol-F18, (d)LTi-Lix-Sol-F18.

Na Figura 15 (a) foi observado o deslocamento do filme sobre o substrato sem lixamento (LTi-SLix-Sol), no contorno do corte, de aproximadamente 7%, que foi classificado como grau 3B, o qual corresponde de 5% a 15% de filme removido, de acordo com a norma ASTM D3359-09. A aderência foi maior para o filme depositado sobre o substrato lixado (LTi-Lix-Sol) [Figura 15 (b)], a qual foi classificada como grau 5B, que corresponde a menos que 5% de área de filme removida.

A adição de partículas de Biovidro F18 ao filme MAP/TEOS diminuiu a aderência do filme ao substrato não lixado e lixado [Figura 15 (c) e (d)]. Esse efeito pode estar relacionado com a reticulação do filme, conforme discutido na seção 5.1.3, o filme MAP/TEOS/F18 apresentou uma maior intensidade para a banda de absorção -OH (1) correspondendo em uma menor reticulação do filme e, conseqüentemente, menor adesão ao substrato (OOIJ *et al.*, 2005; KREGIEL,2014; SALVADOR *et al.* 2018). Além disso, foi observado que o deslocamento se estendeu por uma maior área, no filme depositado sobre o substrato sem lixamento, que foi classificada como grau 2B (15% a 35% de área de filme removida). Já o processo de lixamento do substrato aumentou a aderência do filme MAP/TEOS/F18 (LTi-Lix-Sol-F18), pois a porcentagem de área de filme removida foi menor, aproximadamente 11%, o que corresponde o grau 3B (5% a 15%), Figura 15 (d). A maior aderência dos filmes

MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 sobre o substrato lixado correlaciona-se com a rugosidade do substrato. Nesse sentido, entende-se que a rugosidade regular e controlada obtida no processo de lixamento conferiu um aumento de pontos de ancoragem e, conseqüentemente, uma melhor adesão do filme ao substrato metálico (KURELLA; DAHOTR, 2005; QU *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018).

Na Figura 16, apresenta-se a análise química complementar por EDS, para avaliação da aderência dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 sobre o substrato metálico lixado e não lixado.

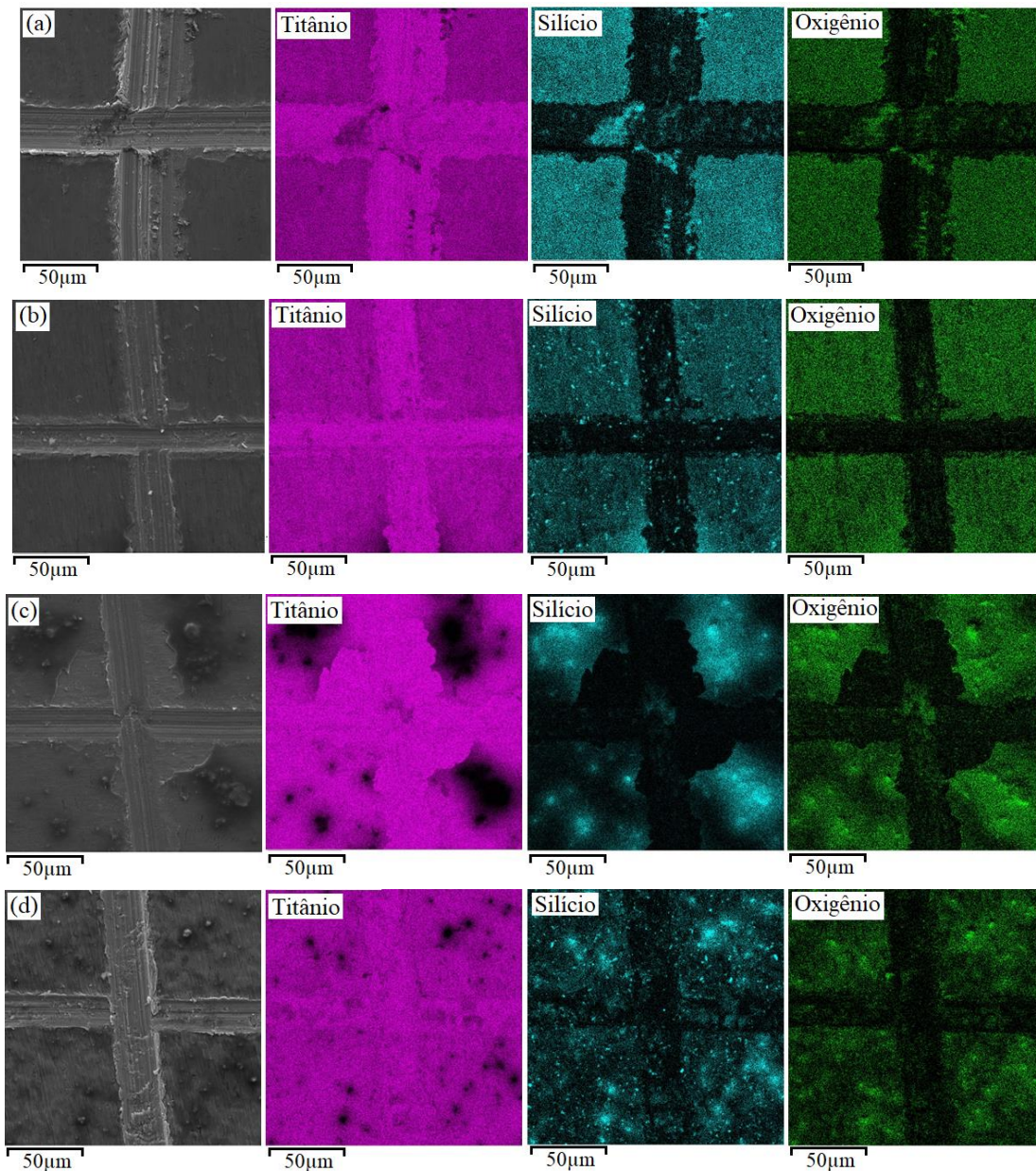


Figura 16. EDS para os quatros sistemas substrato-filme: (a) LTi-SLix-Sol, (b) LTi-Lix-Sol, (c) LTi-SLix-Sol-F18, (d) LTi-Lix-Sol-F18.

A análise dos mapas de EDS dos principais elementos químicos que compõem o filme MAP/TEOS permitiu corroborar o seu deslocamento. Observou-se na Figura 16 (a) e (b), que na região do corte do ensaio de aderência, a intensidade da cor rosa, correspondente ao elemento Ti, é mais intensa, enquanto que a intensidade das cores verde-água (Si) e verde (O) é muito menor, fatos que indicam ausência do filme nessa região, ou seja, confirmando que ocorreu o deslocamento do filme MAP/TEOS. Além disso, verificou-se que adição de biovidro favoreceu o deslocamento, visto que houve um aumento na fração de área de maior intensidade de cor correspondente ao Ti [Figura 16 (c) e (d)].

5.2.5 Ângulo de contato - substratos e sistemas substrato-filme

A Figura 17 apresenta os resultados de ângulo de contato que permitiram avaliar o caráter hidrofílico do substrato sem e com lixamento e dos sistemas substrato-filme MAP/TEOS e substrato-filme MAP/TEOS/F18. Observou-se que todas as amostras apresentaram ângulo de contato menor que 90°, o que caracteriza as suas superfícies como hidrofílicas.

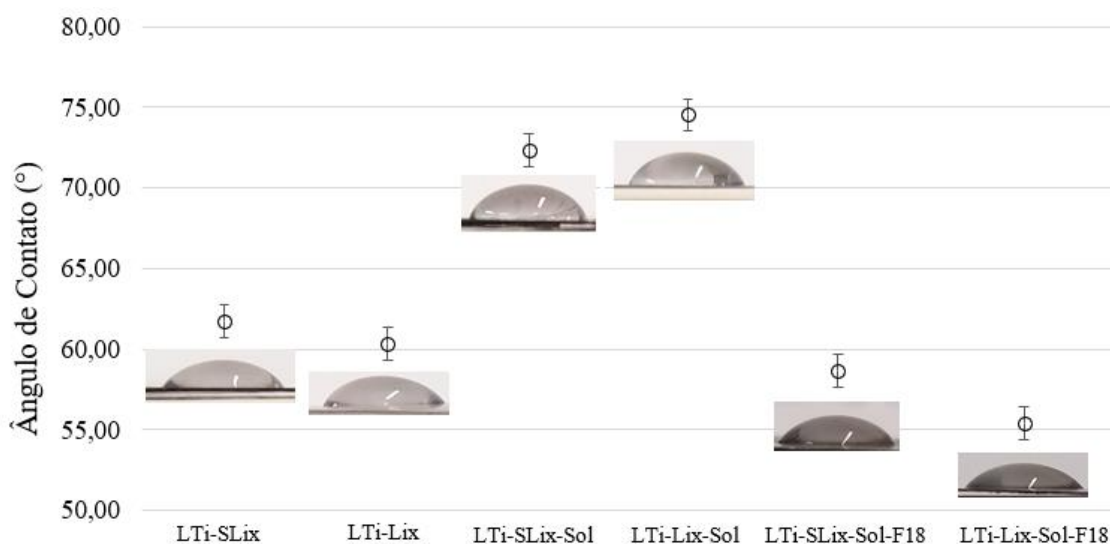


Figura 17. Ensaio de molhabilidade dos substratos sem e com lixamento e dos sistemas substrato-filme MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 de por Ângulo de contato.

Apesar do substrato metálico ter apresentado uma variação de rugosidade, após lixamento, observou-se na Figura 17, que a topografia não influenciou no ângulo de

contato. A mesma tendência relacionada ao efeito da rugosidade ocorreu nos sistemas substrato-filme MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18.

De acordo com o modelo de Cassie-Baxter (1944) (Figura 18, adaptado de Cengiz; Cansoy (2014) pela inserção da representação do ângulo), no qual a gota repousa sobre uma superfície composta de ar aprisionado nas micro e nano cavidades de sua topografia rugosa, cita que a combinação de asperezas em escala nanométrica amplifica as asperezas da superfície, o que favorece a contenção de maior volume de ar. Assim, analisando as amostras de um mesmo grupo, LTi-SLix com LTi-Lix, LTi-SLix-Sol com LTi-Lix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18 com LTi-Lix-Sol-F18, nota-se que esse ar aprisionado nas asperezas, de uma certa forma, influenciou nos efeitos da superfície sobre a molhabilidade. Esses efeitos foram semelhantes dentro dos grupos, pois a composição química e a topografia da superfície, alteradas pelos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 são variáveis que influenciam diretamente na molhabilidade da amostra (BAXTER, 1944; WANG; XIONG, 2014).



Figura 18. Molhamento da gota sobre a superfície rugosa segundo o modelo de Cassie Baxter. Adaptado de Cengiz; Cansoy (2014).

Em relação ao caráter hidrofílico observado para o substrato lixado e não lixado da liga Ti-6Al-4V, pode estar associado à presença de hidroxilas depositadas sobre o filme TiO₂ no processo de preparação das amostras (Etapa 2). Portanto, a camada de TiO₂ apresenta uma pequena carga negativa, devido aos grupos hidroxilas, o que pode influenciar a ocorrência de diversas interações químicas com a gota de SBF, como ligações de hidrogênio, covalentes, iônicas e van der Waals. Desta forma, as hidroxilas podem ter viabilizado a interação da superfície do substrato metálico com a gota de SBF, o que, conseqüentemente, resultou em maior hidrofília da superfície (POPAT, *et al.*, 2007; YANG, *et al.*, 2014).

Observou-se, também, que a hidrofiliidade do substrato metálico foi menor em relação aos sistemas substrato-filme MAP/TEOS e maior em relação ao sistema substrato-filme MAP/TEOS/F18. Esse resultado pode estar relacionado com a variação das alturas das protuberâncias, daquelas inerentes à topografia (rugosidade) das superfícies e aquelas resultantes da presença das nanopartículas de biovidro. Por um lado, a variação das alturas das protuberâncias se refletiu na diminuição da rugosidade com a aplicação do filme MAP/TEOS e, conseqüentemente, em um aumento do ângulo de contato que, por sua vez, resultou em uma diminuição do grau de hidrofiliidade (BONN *et al.*, 2009; CHOWDHURY *et al.*, 2017). Por outro lado, a variação das alturas das protuberâncias da superfície se refletiu em um aumento da rugosidade pela presença das partículas de biovidro que, conseqüentemente, diminuiu o ângulo de contato e, portanto, aumentou o caráter hidrofílico.

Em seu estudo sobre a relação de nanoestruturas e molhamento, Chowdhury *et al.* (2017) citaram que a presença de nanopartículas podem alterar a topografia da superfície, devido à alteração nas alturas das protuberâncias, assim proporcionar diferentes interações com a solução líquida. A presença de nanoestruturas pode transformar uma superfície hidrofóbica em super-hidrofóbica ou hidrofílica.

Além da rugosidade e das interações químicas, o nível de reticulação dos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 também pode influenciar na hidrofiliidade dos sistemas, pois o efeito barreira do filme corresponde com o nível de reticulação do mesmo. Assim, quanto maior o efeito barreira do filme maior o ângulo de contato.

Conforme discutido na seção 5.1.3, a banda de absorção -OH (1) apresentou maior intensidade para o filme MAP/TEOS/F18, em relação ao filme MAP/TEOS, correspondendo em uma menor reticulação do filme e, conseqüentemente, aumentando seu caráter hidrofílico. Em um filme com boa reticulação, o efeito barreira impede a permeabilidade de eletrólitos e íons através do filme, o que pode explicar o maior ângulo de contato do filme MAP/TEOS, que apresentou menor intensidade da banda -OH (1) (seção 5.1.3) (OOIJ *et al.*, 2005; KREGIEL, 2014).

5.2.6 Resistência à corrosão - substratos e sistemas substrato-filme

Os resultados da análise do potencial de circuito aberto (OCP), para todas as amostras são representados na Figura 19. Analisando os valores do potencial de circuito aberto constatou-se que as amostras com substrato metálico sem lixamento apresentaram valores de potencial positivos, o que os torna mais nobres ou mais catódicos. Para os substratos metálicos com e sem lixamento, observou-se uma diferença no comportamento frente à corrosão, pois a amostra lixada (LTi-Lix) apresentou um potencial mais negativo em relação à amostra sem lixamento (LTi-SLix). Essa diferença pode estar relacionada com o filme de óxido de titânio (TiO_2) presente na amostra sem lixamento, o qual funciona como um filme protetor contra a corrosão (ALVES, *et al.*,2017). O processo de lixamento pode ter removido a película protetora de TiO_2 , o que propiciou a exposição da superfície metálica livre ao ataque do meio corrosivo. Isso pode explicar o aumento do potencial de circuito aberto do substrato com lixamento (LTi-Lix) para os valores mais negativos, tornando-o o mais anódico entre todas as amostras (o menos nobre).

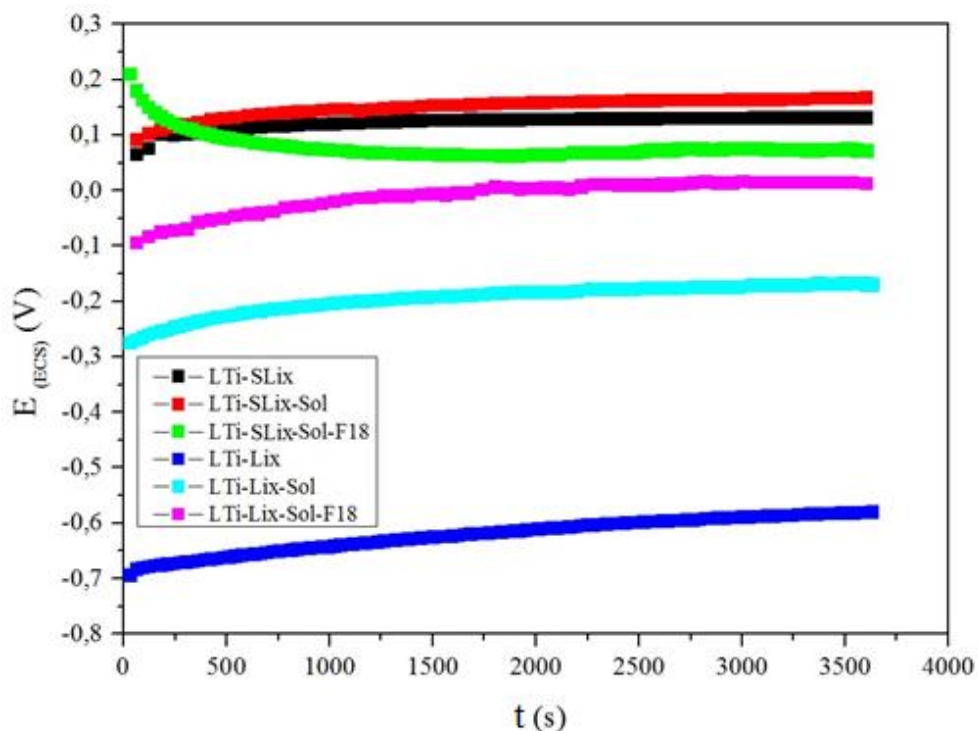


Figura 19. Curvas de Potencial de Circuito Aberto para todas as amostras.

O sistema substrato-filme MAP/TEOS depositado sobre o substrato sem lixamento (LTi-SLix-Sol) apresentou os valores de potencial de circuito aberto mais nobres, os quais ficaram próximos aos do substrato sem lixamento (LTi-SLix), o que indica que o filme MAP/TEOS manteve o caráter protetor contra a corrosão. Esse resultado vai de encontro com as análises de MEV-FEG e ângulo de contato. Na análise de MEV-FEG [Figura 12 (b)], consta que o filme não apresentou fissuras, e em relação ao ângulo de contato (Figura 17), o mesmo apresentou maior valor, resultando em um filme homogêneo, menos hidrofílico e mais protetor. Já o filme MAP/TEOS depositado sobre o substrato lixado (LTi-Lix-Sol), apresentou valores de potencial menos nobres e negativos, o que indica a formação de um filme com menor caráter protetor contra a corrosão, em relação aos sistemas com substrato sem lixamento (KUNST, *et al.*, 2014-A; SALVADOR, *et al.*, 2018).

O filme MAP/TEOS/F18 sobre o substrato sem lixamento (LTi-SLix-Sol-F18) apresentou valores de potencial mais nobres e positivos, quando comparado ao filme sobre o substrato com lixamento (LTi-Lix-Sol-F18). No entanto, observou-se para esse sistema a curva atingiu valores menos catódicos nos primeiros 1250 s de ensaio. Esse comportamento pode estar relacionado com as fissuras observadas no MEV-FEG, [Figura 12 (e)], as quais criaram caminhos preferenciais para a permeabilidade do eletrólito, o que possibilitou o contato da superfície metálica com o meio corrosivo (MOHAMMADLOOA *et al.*, 2012). Porém, a partir de 1250 s, a curva entrou em equilíbrio e se manteve em um nível constante até o final do ensaio de corrosão. Esse último comportamento da curva de OCP pode estar relacionado com a aderência do filme [Figura 15 (e)], a qual foi maior no sistema lixado. Cabe ressaltar que a aplicação de Biovidro F18 no filme sobre o substrato lixado (LTi-Lix-Sol-F18) tornou a superfície menos anódica, pois os valores de potencial de circuito aberto desse sistema ficaram mais próximos daqueles correspondentes aos sistemas com substrato sem lixamento.

5.2.7 Análise biológica - substratos com e sem lixamento e sistemas substrato-filme

5.2.7.1 Morfologia celular

As micrografias obtidas por MEV-FEG para o substrato sem lixamento e para os substratos com filme MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18, seguem apresentados da Figura 20 a Figura 22.

Na Figura 20 foi possível observar o comportamento morfológico das células MG-63 em 1 dia de contato com as amostras LTi-SLix [Figura 20 (a)], LTi-SLix-Sol [Figura 20 (b)] e LTi-SLix-Sol-F18 [Figura 20 (c)]. Em todas as condições testadas foi constatado crescimento celular. A amostra LTi-SLix exibiu células com citoplasma definido, o que indica que a superfície proporcionou condições favoráveis a adaptação celular. Nos sistemas LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18 observou-se a presença de diversos núcleos arredondados e pouca matriz extracelular, em relação ao sistema LTi-SLix, isso pode estar relacionado a fase de adaptação das células aos filmes MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 (DALBY, *et al.*; 2014; HUANG, *et al.*, 2016; LEE, *et al.*, 2017).

Em 4 dias de contato com as células MG-63 (Figura 21), as células aderidas exibiram morfologia diferentes, apresentando forma mais alongada e estrelada, característica de células viáveis e adaptadas (HUANG, *et al.*, 2016). Na superfície LTi-SLix [Figura 21 (a)], as células evoluíram para estruturas mais arredondadas e se espalharam longitudinalmente. Na amostra LTi-SLix-Sol [Figura 21 (b)], as células se alongaram assim como, as células semeadas na superfície do sistema LTi-SLix-Sol-F18 [Figura 21 (c)]. Em geral, as células MG-63 tendem a ser arredondadas na superfície metálica e alongadas na superfície com filme (HUANG, *et al.*, 2016).

Em 7 dias, em todas as amostras, grande parte da superfície foi coberta por protruções do citoesqueleto das células, indicando que as estruturas são benéficas para a ancoragem celular (DALBY, *et al.*; 2014; HUANG, *et al.*, 2016; LEE, *et al.*, 2017).

Neste contexto, a rugosidade (Tabela 6) dos sistemas LTi-SLix ($R_a=7,60$ nm) [Figura 21 (a)] e LTi-SLix-Sol-F18 ($R_a=16,61$ nm) [Figura 21 (c)] favoreceu uma maior área de contato para células do que o substrato LTi-SLix-Sol ($R_a=10,12$ nm), o que é

evidenciado pelo alongamento das membranas e pela proliferação celular na superfície de ambos. O substrato LTi-SLix-Sol, não apresentou células mortas ou contraídas, no entanto a atividade celular se mostrou inferior aos dos demais sistemas, apresentando células mais arredondadas, o que pode estar relacionado com o seu menor valor de Ra (10,12 nm).

A partir dos resultados descritos acima, verificou-se que as alturas das protuberâncias bem como a nano rugosidade das superfícies podem modular especificamente a morfologia celular. Este fato está relacionado com as projeções das membranas, as quais permitem que as células sondem a superfície a fim de encontrar pontos de adesão favoráveis (ZAREIDOOST, *et al.* 2012; DALBY, *et al.*; 2014; OLIVARES-NAVARRETE, *et al.*, 2015; HUANG, *et al.*, 2016).

Conforme citado anteriormente na seção 3.3.2, pesquisadores citam que a rugosidade e topografia em escala micro e nanométrica podem influenciar na interação celular, uma vez que, a estrutura celular como, citoesqueleto, proteínas e transmembrana apresentam dimensões em escala nano (WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2009; BIGGS, *et al.* 2010; GITTENS, *et al.*, 2011; ZAREIDOOST, *et al.*, 2012; OLIVARES-NAVARRETE, *et al.*, 2015; HUANG, *et al.*, 2016).

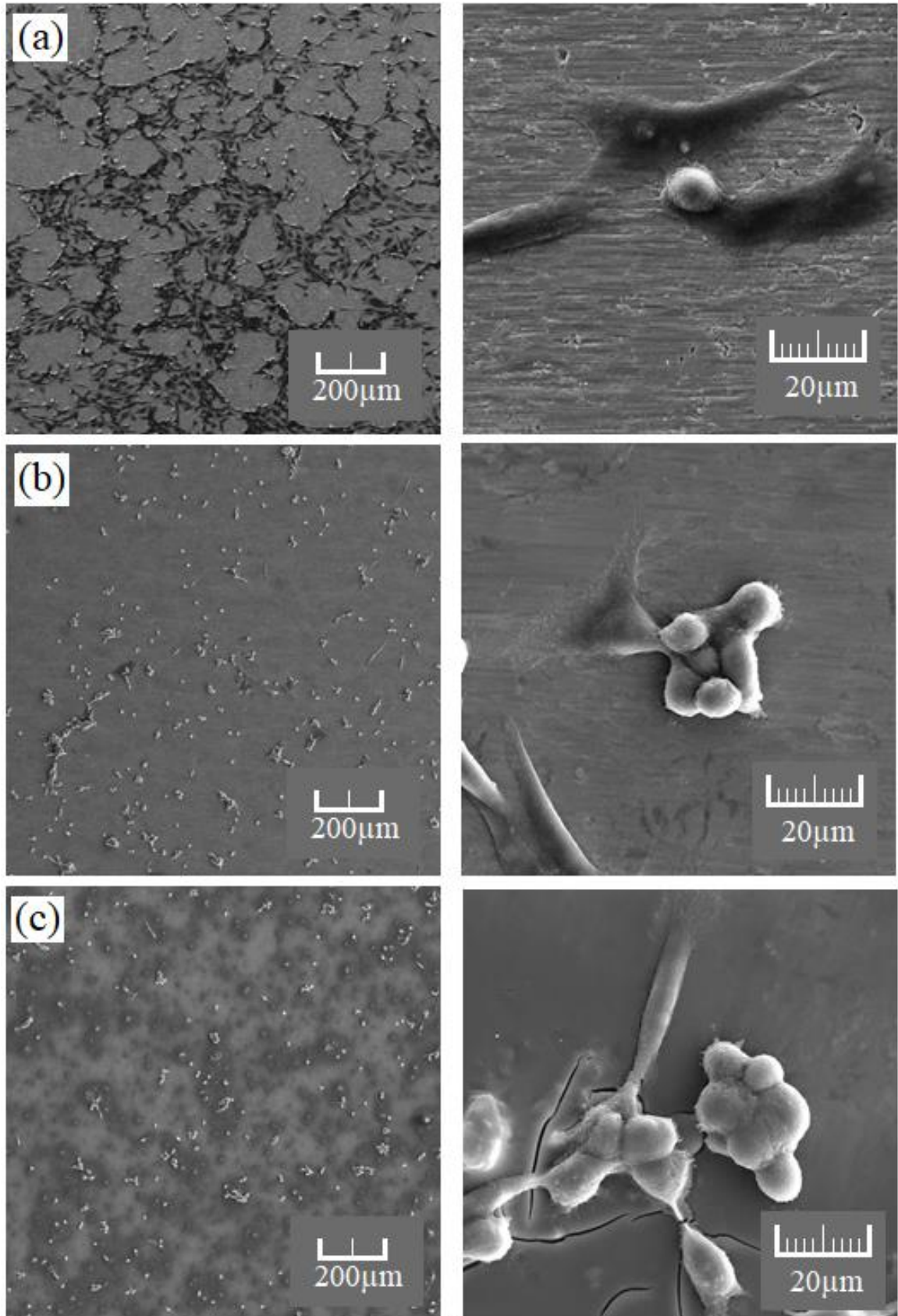


Figura 20. Micrografias no MEV-FEG em 1 (um) dia de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-SLix; (b) LTi-SLix-Sol e (c) LTi-SLix-Sol-F18.

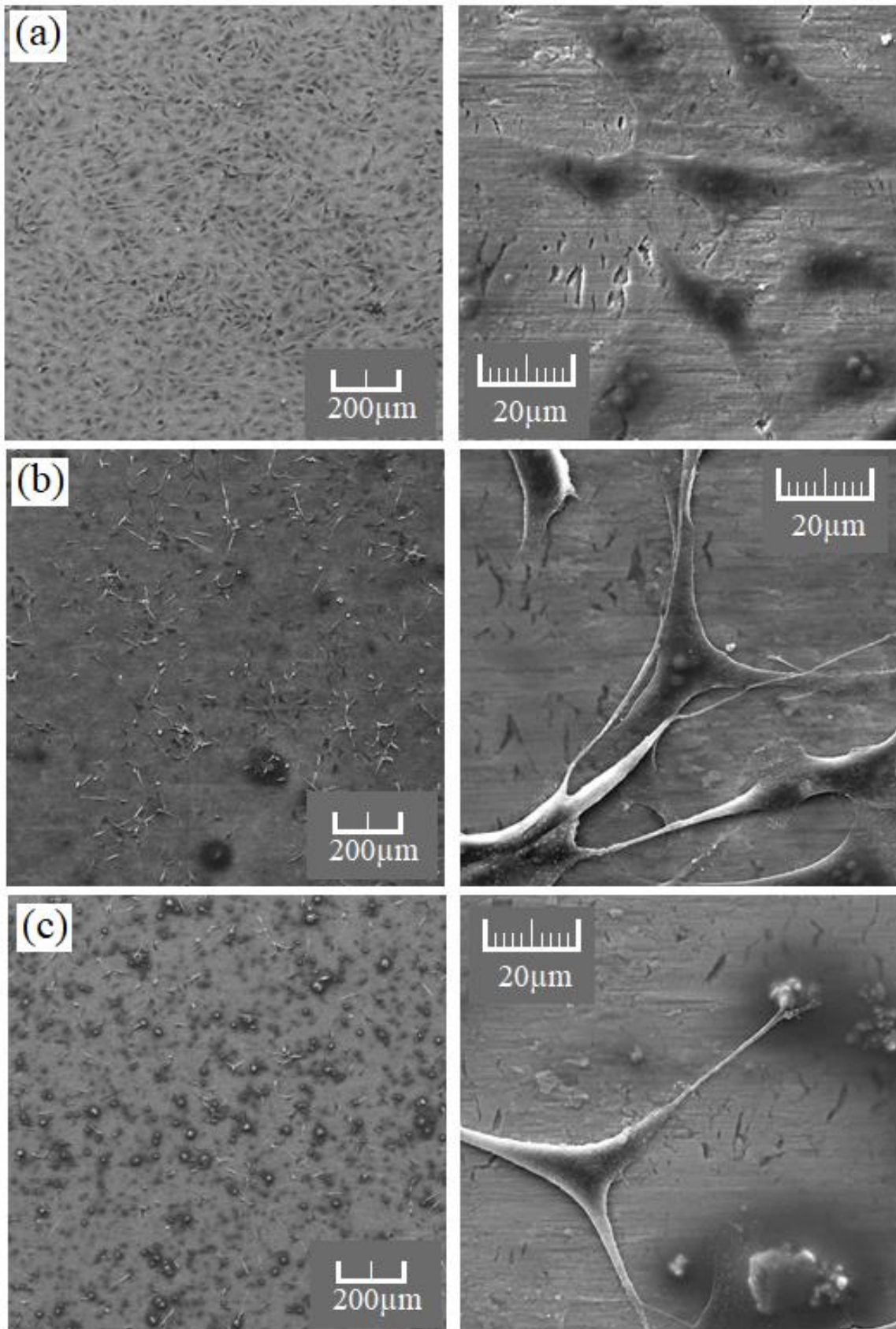


Figura 21. Micrografias no MEV-FEG em 4 (quatro) dias de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-SLix; (b) LTi-SLix-Sol e (c) LTi-SLix-Sol-F18.

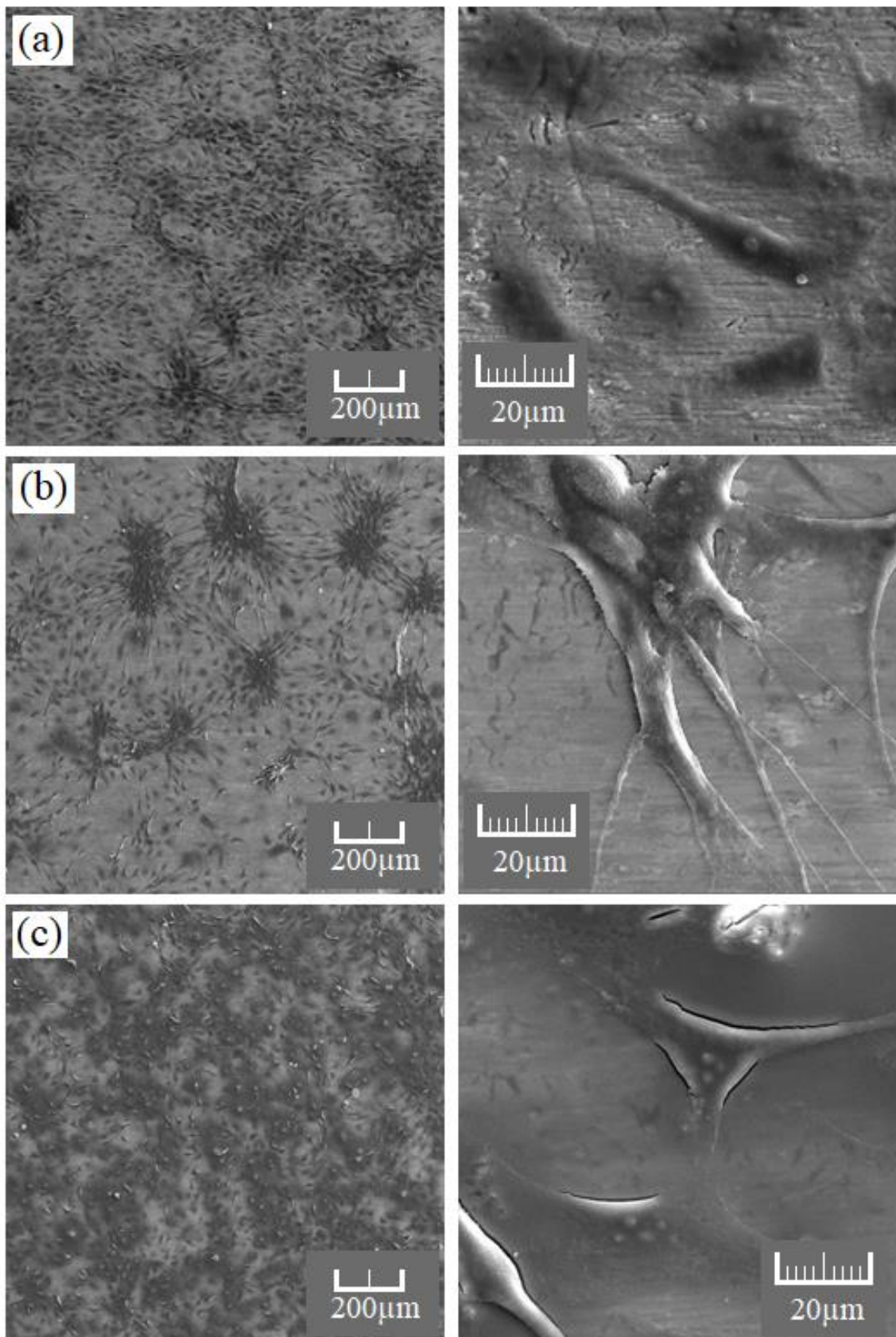


Figura 22. Micrografias no MEV-FEG em 7 (sete) dias de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-SLix; (b) LTi-SLix-Sol e (c) LTi-SLix-Sol-F18.

As micrografias obtidas por MEV-FEG para o substrato lixado e para os sistemas substrato-filme MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18, seguem apresentadas da Figura 23 a Figura 25.

Para 1 dia de contato das células MG-63 com o substrato com lixamento e substrato-filme MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 (Figura 23), foi observado que a amostra LTi-Lix exibiu apenas matriz extracelular, o que indica a fase de adaptação das células. Nos sistemas LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18 observou-se a presença de maior intensidade de matriz extracelular, mais evidenciada para a amostra LTi-SLix-Sol-F18. A matriz extracelular, para ambos os sistemas LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18, apresentou forma alongada e estrelada, característica de células viáveis (HUANG, et al., 2016).

Essa maior intensidade de matriz celular observada na amostra LTi-SLix-Sol-F18, pode estar relacionada com o Biovidro F18, o qual possui a propriedade de ativar a superfície da amostra e, com isso, proporcionou a interação biológica da superfície com as células, aumentando a velocidade de adaptação das células a superfície em relação as amostras LTi-Lix e LTi-Lix-Sol (HENCH, *et al.*, 1969; OMAR, *et al.*, 2015).

Em 4 dias de contato com as células MG-63 (Figura 24), as células aderentes exibiram morfologia diferentes, apresentando forma mais alongada e estrelada, característica de células viáveis e adaptadas (HUANG, et al., 2016). Na superfície LTi-SLix [Figura 24 (a)], as células evoluíram para estruturas mais arredondadas e se espalharam longitudinalmente. Na amostra LTi-SLix-Sol [Figura 24 (b)], as células se alongaram assim como, as células semeadas na superfície do sistema LTi-SLix-Sol-F18 [Figura 24 (c)]. Em geral, as células MG-63 tendem a ser arredondadas na superfície metálica e alongadas na superfície com filme (HUANG, *et al.*, 2016).

Em 7 dias de contato com as células MG-63 (Figura 25), as células aderentes apresentaram citoplasma com morfologia estrelada e alongadas, além de estarem espalhadas longitudinalmente em toda a superfícies das amostras.

Pela micrografia da amostra LTi-Lix, [Figura 25 (a)] observou-se que há grande quantidade de matriz extracelular, definidas pelas regiões mais escuras, sugerindo que as células estão na fase de adaptação a superfície (MALAVAL, *et al.*; 1999; HUANG, *et al.*, 2016). Pelas micrografias obtidas para as amostras LTi-Lix-Sol [Figura 25 (b)] e

LTi-Lix-Sol-F18 [Figura 25 (c)] foi possível observar que a topografia da superfície influenciou positivamente na atividade celular, possibilitando que as células se organizassem sobre a superfície em forma de camadas, ou seja, aglomerações em diversos planos (HUANG, *et al.*, 2016; LEE, *et al.*, 2017). Este resultado pode estar associado com os maiores valores de Ra, 14,70 nm para LTi-Lix e 20,71 nm para LTi-Lix-Sol-F18 em relação a amostra LTi-Lix-Sol (Ra=11,30), os quais influenciaram de forma benéfica a ancoragem e atividade celular (DALBY, *et al.*; 2014; HUANG, *et al.*, 2016; LEE, *et al.*, 2017). No entanto, as células cultivadas sobre a superfície LTi-Lix-Sol-F18 exibiram uma morfologia menos alongada em relação as amostras LTi-Lix e LTi-Lix-Sol, que pode estar presumivelmente relacionada pelo aumento da densidade celular, que limitou o espaço para o alongamento da matriz extracelular (MALAVAL, *et al.*; 1999; HUANG, *et al.*, 2016).

Além da rugosidade, a hidrofília da superfície é outro fator decisivo na viabilidade celular, uma vez que superfícies hidrofílicas propiciam melhores interações com os fluídos biológicos, absorção de proteínas, células e tecidos, favorecendo a adesão e disseminação de células (MORAVEC *et al.*, 2016; SAHA, *et al.*, 2018). Neste sentido, todos os sistemas analisados possuem caráter hidrofílico, sendo que os sistemas LTi-SLix-Sol-F18 e LTi-Lix-Sol-F18, apresentaram menores valores para ângulo de contato colaborando com a literatura, pois os mesmos apresentaram maior densidade celular em 7 dias de análise [Figura 22 (c) e Figura 25 (c)].

Em relação a incorporação de Biovidro F18, nos sistemas LTi-SLix-Sol-F18 e LTi-Lix-Sol-F18, foi possível observar que as células apresentaram afinidade pelas partículas, uma vez que, as regiões com maior densidade celular estão situadas próxima ou sobre as partículas [Figura 22 (c) e Figura 25 (c)]. Na Figura 21 e Figura 24 (c) pode-se observar a afinidade das células pelas partículas de biovidro, pois as protusões da membrana celular se alongaram sobre as partículas de Biovidro F18, o que indica que a célula se adaptou e identificou o Biovidro F18 como parte integrante de seu sistema biológico.

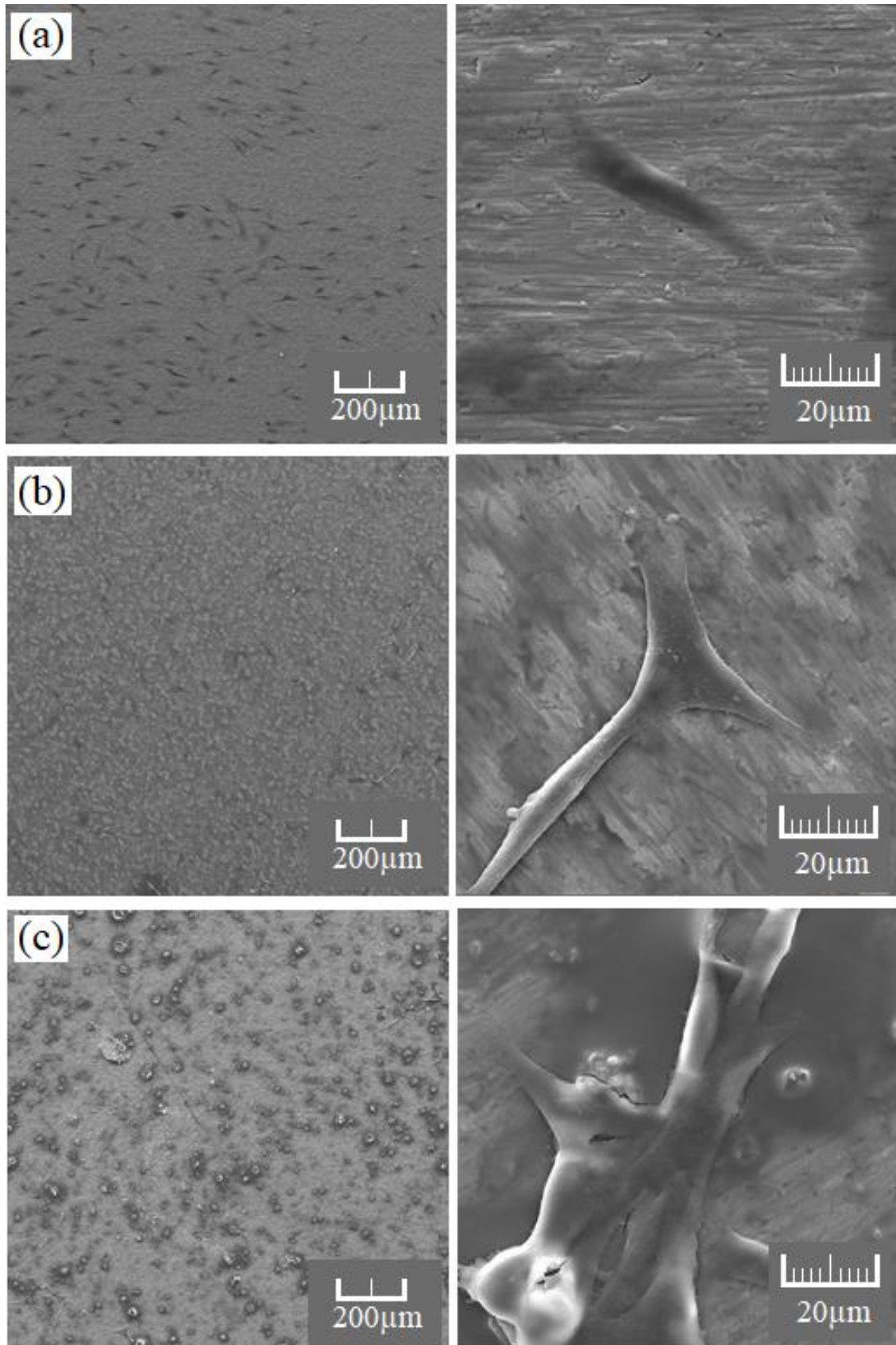


Figura 23. Micrografias no MEV-FEG em 1 (um) dia de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-Lix; (b) LTi-Lix-Sol e (c) LTi-Lix-Sol-F18.

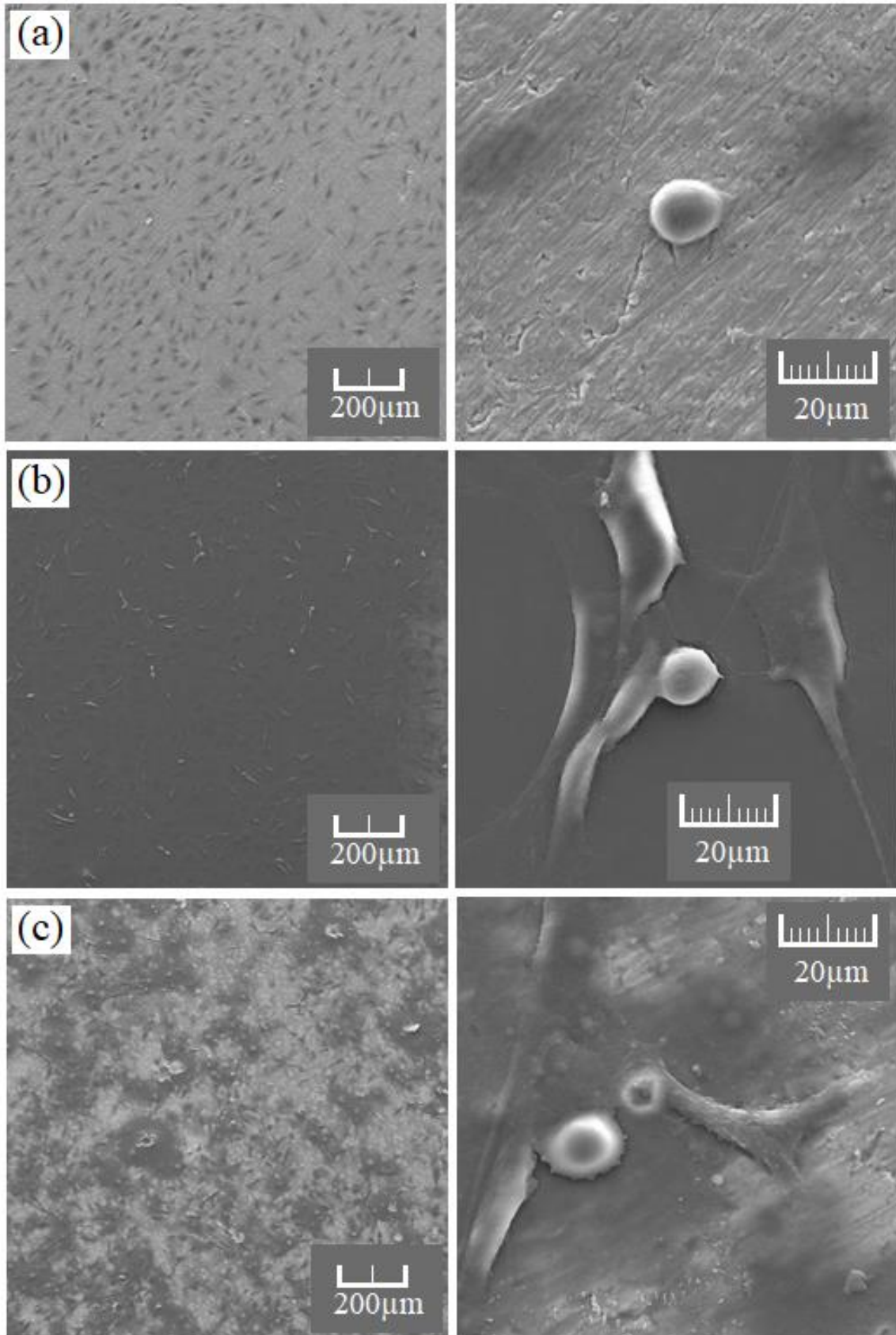


Figura 24. Micrografias no MEV-FEG em 4 (quatro) dias de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-Lix; (b) LTi-Lix-Sol e (c) LTi-Lix-Sol-F18.

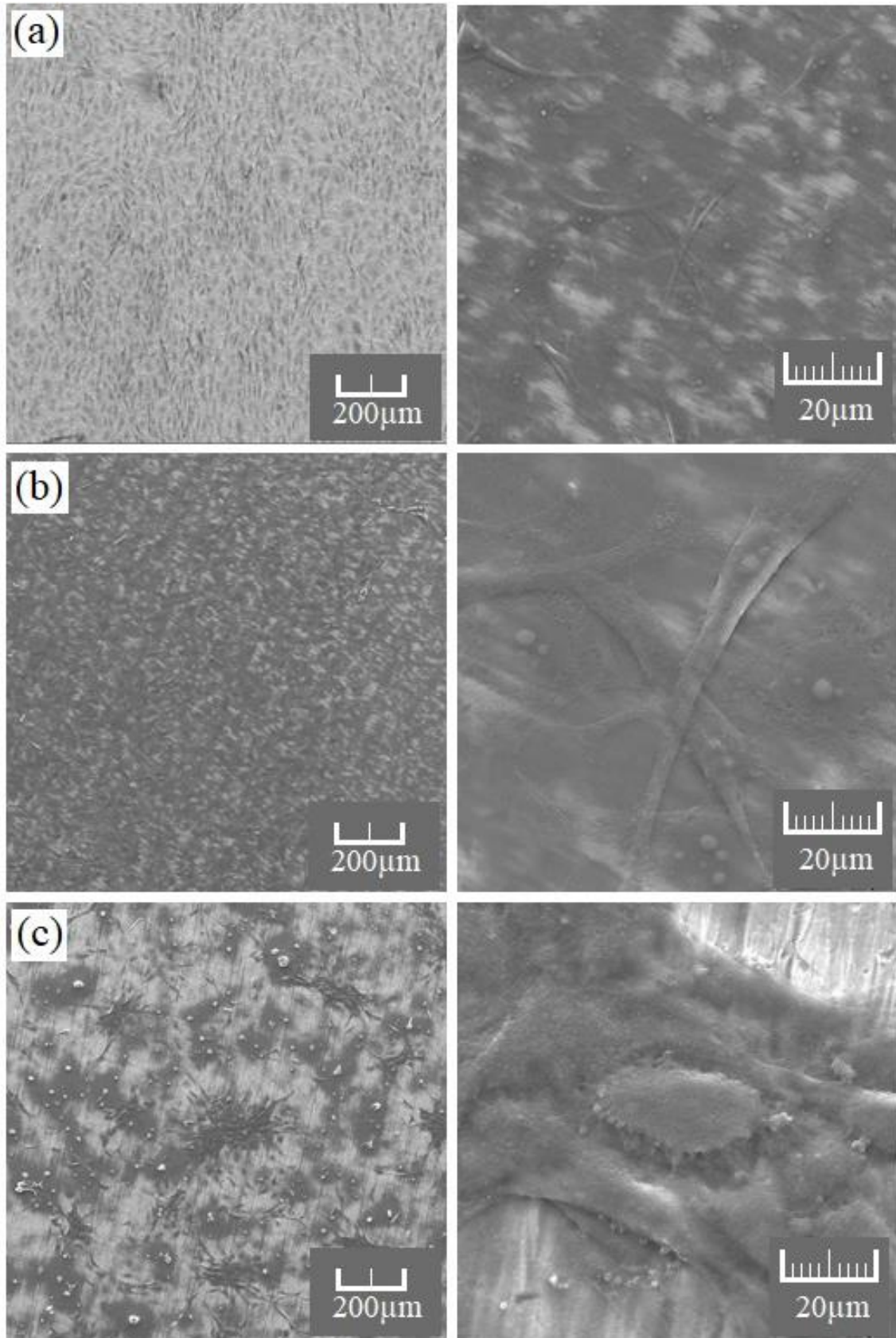


Figura 25. Micrografias no MEV-FEG em 7 (sete) dias de contato com células MG-63 (osteossarcoma), sendo (a) LTi-Lix; (b) LTi-Lix-Sol e (c) LTi-Lix-Sol-F18.

5.2.7.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método indireto do ensaio de redução celular por brometo de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT), onde foi verificado o metabolismo celular por meio da atividade mitocondrial. As células viáveis na presença do reagente assumem uma cor lilás, devido a presença dos cristais de formazan formados, aumentando a absorbância lida no espectrofotômetro. Já as células mortas apresentam uma leitura de absorbância baixa, devido a formação de poucos cristais de formazan (GALDINO, *et al.*, 2014).

Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade, sendo a absorbância do controle negativo representando 100% de viabilidade e, os valores das células tratadas foram calculados como porcentagem do controle negativo. Portanto, Todas as condições testadas foram comparadas com o controle negativo, o qual corresponde a viabilidade celular de 100%.

A Figura 26 expressa as porcentagens de viabilidade obtidas para cada amostra, LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18, além dos controles positivos e negativos. O percentual de viabilidade celular foi obtido para os períodos de 1, 4 e 7 dias de contato das amostras com às células MG-63. A Figura 27 expressa as porcentagens de viabilidade obtidas para as amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18.

Para o grupo de amostras referente a 1 dia de contato com às células MG-63, os resultados indicam que não ocorreu diferença estatística entre as amostras e o controle negativo.

Em relação ao 4^o dia, o grupo controle positivo apresentou viabilidade estatisticamente menor comparado com o grupo controle negativo. Esse comportamento já era esperado, uma vez que o meio DMEM acrescido de 5% de DMSO, adicionado ao grupo controle positivo, mostrou-se agressivo as células, o que carretou a morte das mesmas. A amostra LTi-SLix não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle negativo. Já os sistemas LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18 apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo e negativo.

No 7º dia, para as amostras LTi-SLix e LTi-SLix-Sol-F18 houve morte celular comparado com o grupo controle negativo. Para o sistema LTi-SLix-Sol o mesmo não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo. O controle positivo apresentou morte celular de forma estatisticamente significativa.

Os resultados obtidos na Figura 26 indicam que as amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18 propiciaram a viabilidade celular sob suas superfícies, indicando que a topografia, molhabilidade e rugosidade, fatores citados por outros pesquisadores como primordiais para a viabilidade celular, atenderam os requisitos necessários exigidos pelas células MG-63 para a presença de atividade celular (WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2009; GITTENS, *et al.*, 2011; ZAREIDOOST, *et al.*, 2012; DALBY, *et al.*; 2014; OLIVARES-NAVARRETE, *et al.*, 2015; HUANG, *et al.*, 2016; HUANG, *et al.*, 2016; LEE, *et al.*, 2017).

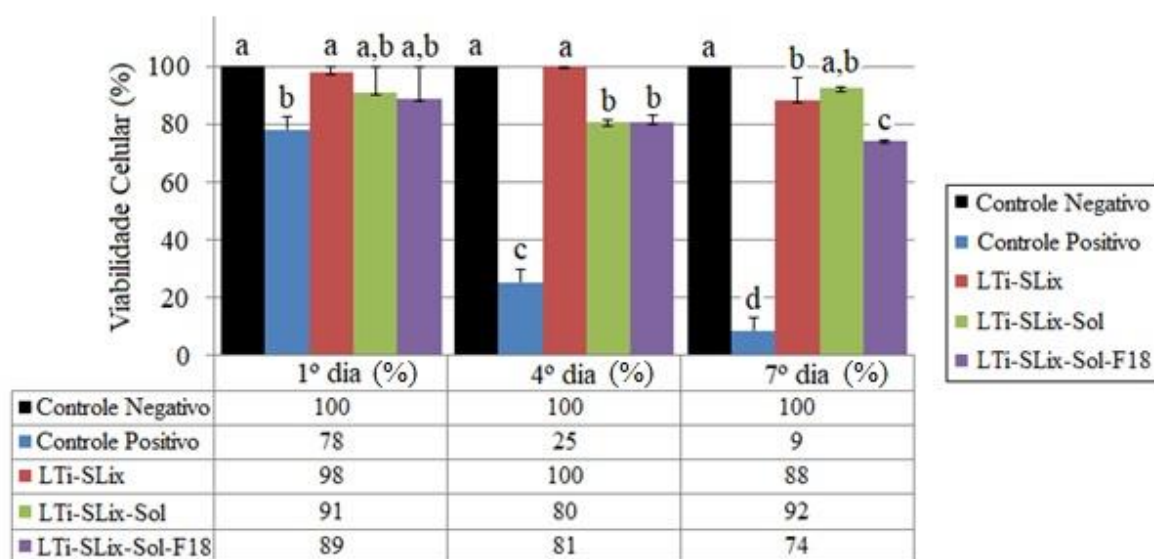


Figura 26. Viabilidade celular avaliada em 1, 4 e 7 dias de contato das células MG-63 com as amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. As letras acima das barras correspondem as comparações dos diversos grupos com o grupo controle; letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

A Figura 27 expressa as porcentagens de viabilidade obtidas para cada amostra, LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18, além dos controles positivos e negativos. O percentual de viabilidade celular foi obtido para os períodos de 1, 4 e 7 dias de contato das amostras com as células MG-63.

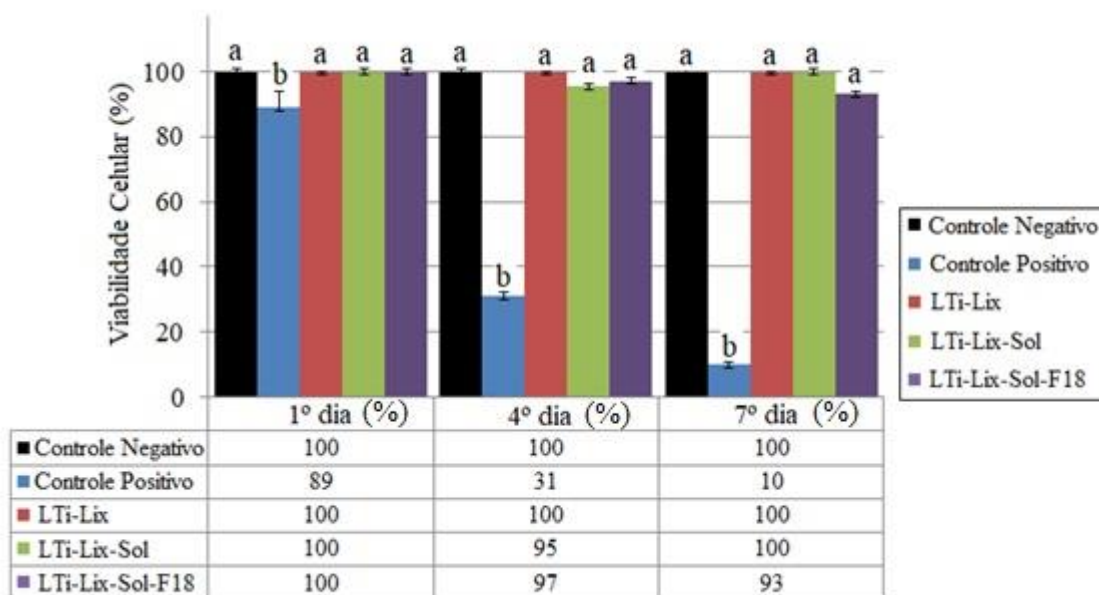


Figura 27. Viabilidade celular avaliada em 1, 4 e 7 dias de contato das células MG-63 com as amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. As letras acima das barras correspondem as comparações dos diversos grupos com o grupo controle; letras diferentes significam diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

As amostras com 1 dia de contato com as células MG-63 exibiram diferença estatisticamente significativa com o controle positivo e não significativa com o controle negativo. Esse comportamento se manteve ao longo dos demais períodos (4 e 7 dias), onde as amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18 são estatisticamente iguais ao controle negativo e estatisticamente diferentes ao controle positivo. Em relação ao controle positivo, a queda no valor percentual está atribuída a presença do meio DMEM, caracterizado por ser agressivo e causar a morte celular.

O comportamento de uma mesma amostra ao decorrer dos períodos de 1 dia, 4 e 7 dias em contato com as células MG-63, também foi avaliado. Conforme, a Figura 27 as amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18, não apresentaram diferença significativa entre os períodos, porém apresentaram valores percentuais de viabilidade celular superiores as amostras sem lixamento (Figura 26).

As amostras lixadas e não lixadas foram comparadas estatisticamente utilizando análise de sentido único de variância (ANOVA) com o teste de comparação de múltiplas médias (Tukey) para avaliar as diferenças estatísticas no caso da distribuição

normal. Significância será aceita para p inferior a 0,05. Os resultados estatísticos seguem apresentados na Tabela 8.

O comportamento de uma mesma amostra no decorrer dos períodos também foi avaliado. Conforme a Tabela 8, a amostra LTi-SLix apresentou diferença significativa no período de 4 e 7 dias, onde foi observado uma queda no percentual de viabilidade celular de 100% para 88%.

Os sistemas LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18, não apresentaram diferença significativa entre os períodos avaliados. No entanto, para 7 dias a amostra LTi-SLix-Sol-F18 apresentou percentual de 74%, o mais baixo entre as condições avaliadas. Segundo a ISO 10993-5, esse percentual ainda está acima do valor considerado citotóxico (viabilidade celular < 70%), conferindo a não toxicidade da amostra.

Tabela 8. Comparação da viabilidade celular de todas as condições testadas.

	1 Dia (%)	4 Dias (%)	7 Dias (%)
LTi-SLix	98 ± 0,1	100 ± 0,3	88 ± 0,2
LTi-SLix-Sol	91 ± 0,3	80 ± 0,2	92 ± 0,1
LTi-SLix-Sol-F18	89 ± 0,4	81 ± 0,5	74 ± 0,4
LTi-Lix	100 ± 0,3	100 ± 0,2	100 ± 0,1
LTi-Lix-Sol	100 ± 0,1	95 ± 0,3	100 ± 0,3
LTi-Lix-Sol-F18	100 ± 0,5	97 ± 0,3	93 ± 0,4
Resultado estatístico	Estatisticamente iguais	Estatisticamente diferentes	Estatisticamente diferentes

Conforme observado na Tabela 8, as amostras sem lixamento apresentaram valores percentuais menores em relação as amostras lixadas, sendo essa diferença estatisticamente significativa em 4 e 7 dias e não significativa em 1 dia. Esses resultados vão de encontro as imagens obtidas por MEV-FEG, onde as amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18, para 7 dias (Figura 22), apresentaram menor densidade de células, em relação aos sistemas LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18 (Figura 25) que exibiram camadas celulares cobrindo toda a superfície das amostras.

Além disso, para os sistemas com filme MAP/TEOS, nos substratos com e sem lixamento, observa-se o aumento do percentual entre 4 e 7 dias, isso pode estar

relacionado a adaptação celular ao substrato e, conseqüentemente, o aumento da proliferação celular (MALAVAL, *et al.*; 1999; HUANG, *et al.*, 2016).

5.2.7.3 Citotoxicidade

A análise de citotoxicidade dos substratos foi analisada pelo método direto com a técnica de coloração usando laranja de acridina e brometo de etídio. A contagem de células em apoptose, coloração laranja, foi realizada por microscópio de fluorescência com 100x de ampliação.

A Figura 28 apresenta os resultados obtidos de citotoxicidade para as amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18.

Na Figura 28 foi possível observar um aumento na atividade proliferativa celular, pela maior intensidade de células viáveis (verdes), a qual ocorreu de forma linear durante os períodos analisados para as amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18. A quantidade de células em apoptose irreversível (laranja) nos sistemas LTi-Lix e LTi-Lix-Sol e LTi-Sol-F18, foi considerada mínima, não sendo significativa em relação a intensidade de células viáveis. Pela Figura 28 não foi observado a existência de células contraídas, ou seja, em apoptose, como as existentes no controle positivo, onde não se visualiza matriz extracelular. A ocorrência de células em apoptose nos sistemas LTi-Lix e LTi-Sol-F18 pode estar relacionada com a intensidade celular, a qual está limitando o crescimento celular e conseqüentemente a morte de algumas células. Esses resultados caracterizam as superfícies das amostras como não citotóxicas (MALAVAL, *et al.*; 1999; HUANG, *et al.*, 2016).

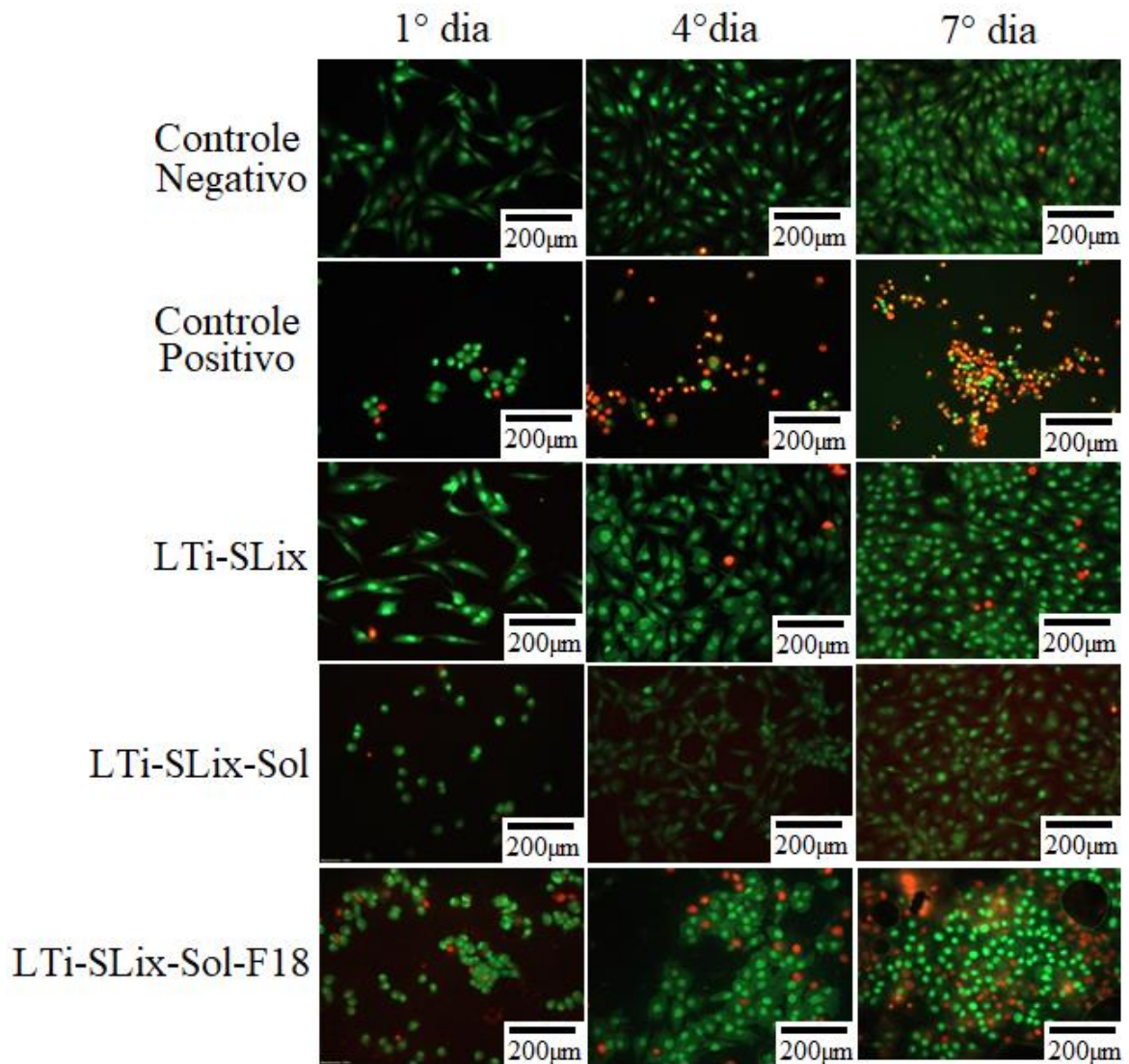


Figura 28. Microscopia de fluorescência para verificação das células vivas e mortas sobre a superfície das amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18.

Diante os resultados obtidos na Figura 29, foi verificado que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18 para a apoptose final/necrose em todos os períodos estudados, comprovando a não citotoxicidade das amostras.

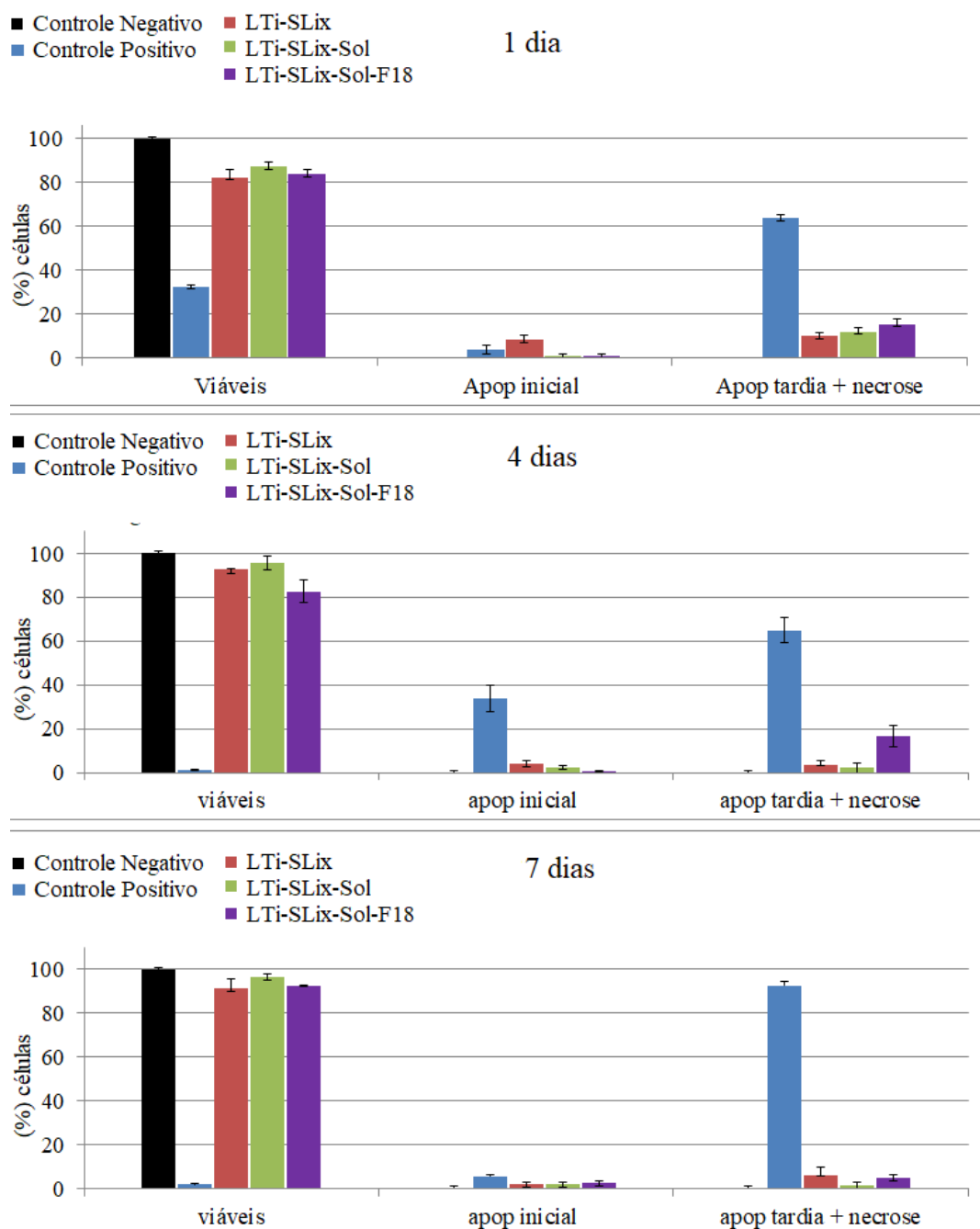


Figura 29. Contagem das células viáveis, em apoptose inicial e apoptose final/necrose para os sistemas LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18 nos tempos de 1 dia, 4 e 7 dias em contato com as células MG-63.

A Figura 30 apresenta os resultados de citotoxicidade para as amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18.

Conforme a Figura 30 foi possível observar que o comportamento celular das amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18 foi semelhante aos verificados nos sistemas e substrato sem lixamento, apresentando um acréscimo na intensidade e

proliferação celular durante os períodos analisados. Pela Figura 30 não foi observado a existência de células contraídas, ou seja, em apoptose (laranja), como as existentes no controle positivo e nos sistemas LTi-SLix e LTi-SLix-Sol-F18. Além disso, às células apresentam maior volume de matriz extracelular, o que indica que adaptação foi efetiva e que as condições testadas são efetivamente promissoras para a viabilidade celular (MALAVAL, *et al.*; 1999; HUANG, *et al.*, 2016). Desta forma, as amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18 foram classificadas como não citotóxicas.

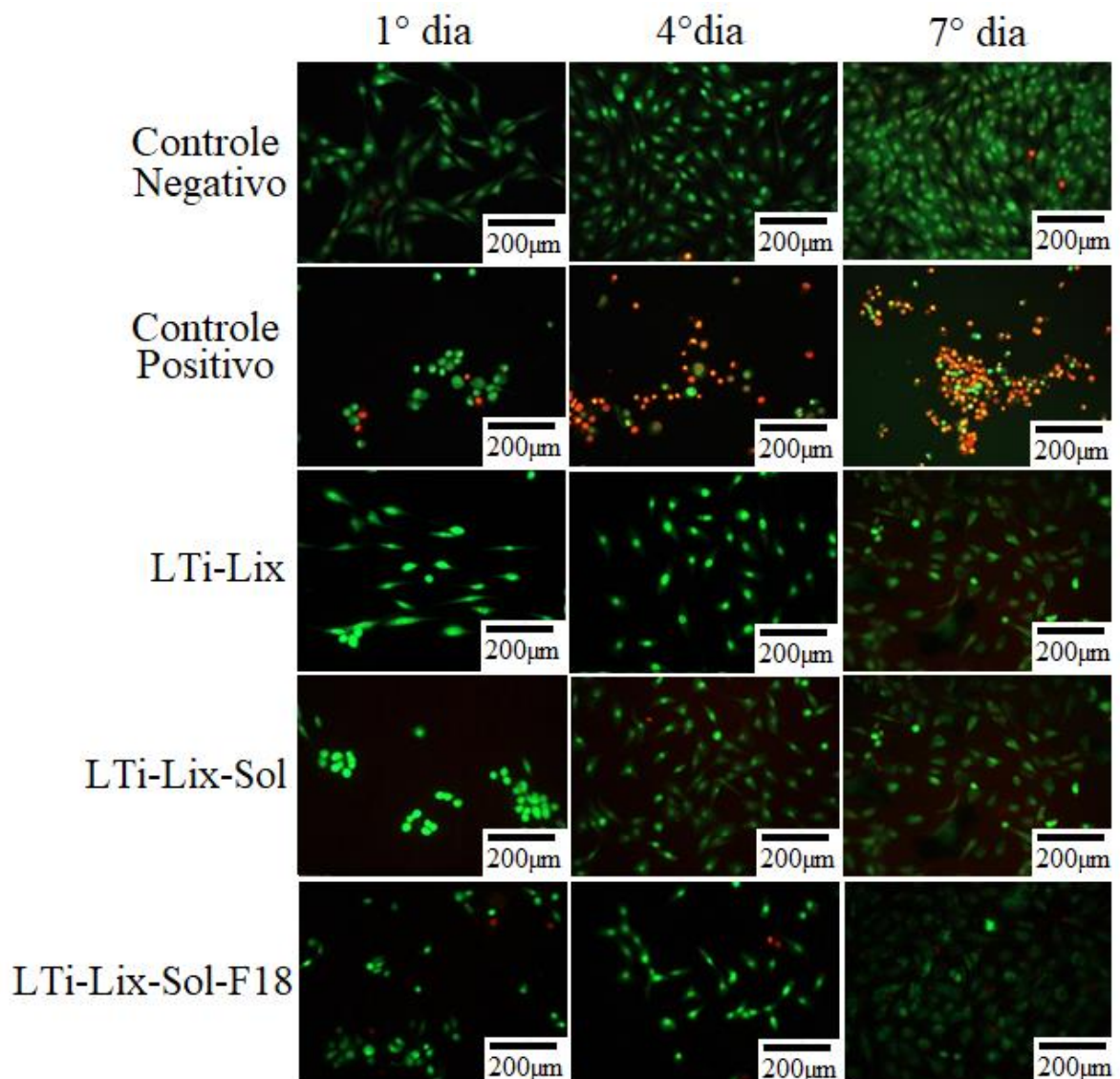


Figura 30. Microscopia de fluorescência para verificação das células vivas e mortas sobre a superfície das amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18.

Os resultados estatísticos do ensaio de citotoxicidade das amostras seguem apresentados na Figura 31.

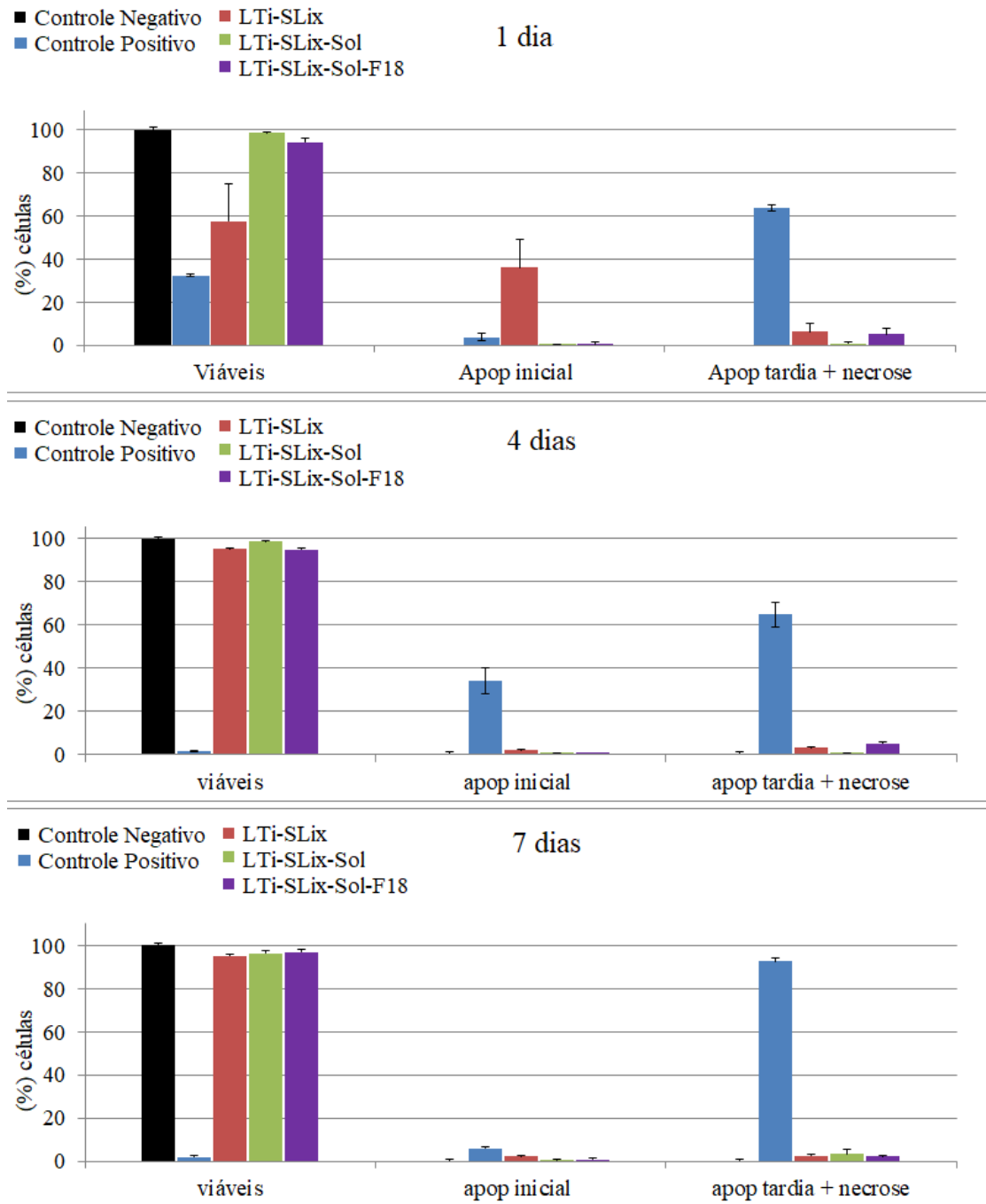


Figura 31. Contagem das células viáveis, em apoptose inicial e apoptose final/necrose para os sistemas LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18 nos tempos de 1 dia, 4 e 7 dias em contato com as células MG-63.

Diante os resultados obtidos na Figura 31, foi verificado que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-

Lix-Sol-F18 para a apoptose final/necrose em todos os períodos estudados, comprovando a não citotoxicidade das mesmas. No entanto, foi observado que o número de células em apoptose final/necrose para as amostras LTi-Lix, LTi-Lix-Sol e LTi-Lix-Sol-F18 é inferior as amostras LTi-SLix, LTi-SLix-Sol e LTi-SLix-Sol-F18, este comportamento pode estar relacionado a topografia e rugosidade das superfícies dos sistemas substrato lixado, as quais apresentaram maiores valores de Ra e conseqüentemente, maiores pontos de ancoragem para as células (WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2009; ZAREIDOOST, *et al.*, 2012; DALBY, *et al.*; 2014; OLIVARES-NAVARRETE, *et al.*, 2015; HUANG, *et al.*, 2016; LEE, *et al.*, 2017).

No que se refere ao sistema substrato-filme MAP/TEOS/F18 foi verificado que as células apresentaram afinidade pelas partículas, conforme discutido na seção 5.2.7.1. Ao analisar a Figura 28 e Figura 30, foi possível observar uma maior densidade de células vivas na superfície das amostras substrato-filme MAP/TEOS/F18 em relação ao substrato e ao sistema substrato-filme MAP/TEOS, indicando que as partículas de Biovidro F18 influenciaram de forma positiva na adaptação celular e na viabilidade celular.

6 CONCLUSÃO

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a resistência à corrosão, viabilidade e citotoxicidade celular da superfície de Ti-6Al-4V revestida com filmes de organosilanos MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18, sendo as principais conclusões a seguir apresentadas.

Com relação a caracterização do biovidro, conclui-se que a incorporação do Biovidro F18 no filme MAP/TEOS não influencia nas propriedades térmicas do filme, o qual apresenta os mesmos eventos que o filme MAP/TEOS/F18, na análise DTG.

Em relação ao pré-tratamento, o processo de lixamento favorece a ancoragem do filme MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18 ao substrato. No entanto, verifica-se que o pré-tratamento de lixamento não produziu variações no caráter hidrofílico do substrato e dos sistemas substrato-filmes. As partículas de Biovidro F18 diminuíram o ângulo de contato do sistema substrato-filme MAP/TEOS/F18 em virtude do aumento da rugosidade do filme. A reticulação também influencia no ângulo de contato dos sistemas substrato-filme, onde o filme com partículas de Biovidro F18 (MAP/TEOS/F18) apresenta a menor reticulação e menor compactação, o que influencia nos resultados de aderência, espessura de camada e resistência a corrosão.

Os filmes de organosilano, sem e com partículas de Biovidro F18, (MAP/TEOS e MAP/TEOS/F18) aumentam a resistência à corrosão do substrato metálico lixado e não lixado. No entanto, se o filme apresentar defeitos, como fissuras, mais evidentes no filme MAP/TEOS/F18 depositado sobre os substratos com menor rugosidade (não lixado), o efeito barreira do filme diminui, devido ao contato do eletrólito com o substrato metálico, o que prejudica a sua resistência à corrosão.

Com relação aos resultados biológicos, de forma geral, as informações obtidas nos ensaios de morfologia, viabilidade e citotoxicidade celular mostram que em todas as condições testadas há crescimento celular atribuído pelos fatores como molhabilidade, rugosidade e topografia da superfície. Sendo que, nos sistemas LTi-SLix-Sol-F18 e LTi-Lix-Sol-F18, as células apresentaram uma maior afinidade pelas partículas de Biovidro F18, devido a maior densidade celular estar situada próximo as

partículas. No que se refere a citotoxicidade, nenhuma amostra testada apresenta morte celular.

Portanto as superfícies com filme MAP/TEOS conferiram ao substrato de Ti-6Al-4V maior resistência a corrosão, tanto para o substrato sem lixamento quanto para o substrato com lixamento. Em relação ao filme MAP/TEOS/F18, apenas o sistema substrato com lixamento apresenta maior resistência a corrosão. Em relação a viabilidade e citotoxicidade celular, os sistemas substrato-filme MAP/TEOS e substrato-filme MAP/TEOS/F18 exibiram grande potencial para viabilidade celular. Conclui-se que os sistemas substrato lixado e não lixado com filme MAP/TEOS, bem como o sistema substrato lixado com filme MAP/TEOS/F18 atenderam os requisitos deste estudo, atribuindo maior resistência a corrosão aos substratos e proporcionando a viabilidade celular.

7 TRABALHOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

7.1 ARTIGO COMPLETO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO

SALVADOR, D.G.; MARCOLIN, P.; BELTRAMI, L. R.; BRANDALISE, R. N.; KUNST, S. R. Development of alkoxides precursors-based hybrid coatings on Ti-6Al-4V alloy for biomedical applications: influence of pH of sol. *Journal of Materials Engineering and Performance* **JCR**, 2018.

MARCOLIN, P.; BELTRAMI, L. R.; BONIATTI, R.; SALVADOR, D.G.; QUEVEDO, M. C.; BASTOS, A. A. C.; FERREIRA, M. G. S.; MALFATTI, C. F.; KUNST, S. R. Electrochemical and mechanical behavior of UV curing paint on hybrid films modified with polyethyleneglycol plasticizer applied on tinplate. *Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração*, 2017.

MARCOLIN, P.; PEDERIVA, L.; SALVADOR, D.G.; BELTRAMI, L. R.; OLIVEIRA, C. T.; KUNST, S. R. Influence of three pre-treatments surface with subsequent poliéster ink application in resistance corrosion steel AISI 1008. *Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração*, 2017.

SALVADOR, D.G.; MARCOLIN, P.; BELTRAMI, L. R.; BRANDALISE, R. N.; KUNST, S. R. Influences of pre-treatment and curing of alkoxysilanes in protecting the Ti-6Al-4V alloy. *Journal of applied polymer science (online)*, 2017.

7.2 TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

MARCOLIN, P.; SALVADOR, D. G.; BELTRAMI, L. V. R.; LONGHI, M.; BRANDALISE, R. N.; KUNST, S.R. Influência do pH na sol-gel para a elaboração de filmes hídricos aplicados sobre o substrato TI-6AL-4V. In: *Cbecimat 2016, 2016, Natal/RN. Cbecimat 2016, 2016*.

MARCOLIN, P.; SALVADOR, D. G.; BELTRAMI, L. V. R.; BRANDALISE, R. N.; KUNST, S.R. Revestimentos ambientalmente correto a base de precursores alcoóxidos aplicados sobre a liga de TI-6AL-4V: influência da preparação da superfície. In: *Cbecimat 2016, 2016, Natal/RN. Cbecimat 2016, 2016*.

MARCOLIN, P.; ROSSI, J. S.; SALVADOR, D. G.; LONGHI, M.; ZINI, L. P.; PEDERIVA, L.; BELTRAMI, L. V. R.; KUNST, S.R. Influência da utilização de três diferentes pré-tratamentos na resistência a corrosão do aço. In: *Cbecimat 2016, 2016, Natal/RN. Cbecimat 2016, 2016*.

MARCOLIN, P.; SALVADOR, D. G.; BONIATTI, R.; KUNST, S.R. Influência da velocidade de retirada do processo de dip-coating usado para aplicar o filme a base de precursores de alcoóxidos no substrato de titânio. In: *Cbecimat 2016, 2016, Natal/RN. Cbecimat 2016, 2016*.

8 APÊNDICE

APÊNDICE A: Metodologia para preparação da solução SBF

*se aparecer precipitado em qualquer etapa da preparação da solução, deve-se descartá-la e começar novamente.

PREPARO DE 1L

- 1) Colocar 700 mL de água dionizada/destilada em um Becker plástico de 1 L
- 2) Colocar o Becker no banho-maria em um recipiente maior em cima do agitador magnético com aquecimento e tampar com vidro de relógio
- 3) Aquecer a água do Becker com agitação até $36,5^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$
- 4) Dissolver 8,035 g de NaCl e não colocar o próximo reagente até que este esteja completamente dissolvido
- 5) Dissolver 0,355 g de NaHCO_3
- 6) Dissolver 0,225 g de KCl
- 7) Dissolver 0,231 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 8) Dissolver 0,311 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 9) Dissolver 39 mL de HCl 1M
- 10) Dissolver 0,292 g de CaCl_2
- 11) Dissolver 0,072 g de Na_2SO_4
- 12) Completar 900 mL de solução com água deionizada/destilada
- 13) Colocar o pHgâmetro na solução (o pH deve estar $2,0 \pm 1,0$)
- 14) Dissolver 6,118 g de Tris pouco a pouco, observando a mudança de pH (colocar um pouco do reagente, esperar dissolver e estabilizar o pH, e só após colocar mais Tris
- 15) Quando o pH estiver em $7,30 \pm 0,05$, observar se a temperatura está em $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para aumentar o pH para 7,45
- 16) Quando o pH estiver em $7,45 \pm 0,01$, parar de dissolver o Tris e colocar HCl concentrado com uma pipeta até baixar o pH para $7,42 \pm 0,01$. Repetir o processo mantendo o pH entre 7,42 e 7,45 até dissolver todo o Tris
- 17) Ajustar a temperatura para $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e deixar o pH para exatamente 7,40 a $36,5^{\circ}\text{C}$

18) Colocar num balão volumétrico e aguardar a temperatura chegar em 20°C para acertar o menisco com água deionizada/destilada

19) Anotar a data que a solução foi feita e o responsável pelo preparo

20) Guardar coberto na geladeira, por até 30 dias

REFERÊNCIAS

- ABDULHAMEED, Z.N. Corrosion Behavior of Some Implant Alloys in Simulated Human Body Environment, Department of Materials engineering, **University of Technology**, 2011.
- ADAMS, L.A.; ESSIEN, E.R.; ADESALU, A.T.; JULIUS, M.L. Bioactive glass 45S5 from diatom biosilica. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 2, p. 476-482, 2017.
- AHMED, A.A.; MHAEDE, M.; WOLLMANN, M.; WAGNER, L. Effect of micro shot peening on the mechanical properties and corrosion behavior of two microstructure Ti-6Al-4V alloy. **Applied Surface Science**, v. 363, p. 50-58, 2016.
- ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Oral implant surfaces: Part 1 – review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. **Int J Prosthodont**, v. 17, p. 536-543, 2004.
- ALVES, A.C.; WENGER, F.; PONTTHIAUX, P.; CELIS, J.P.; PINTO, A.M.; ROCHA, L.A.; FERNANDES, J.C.S. Corrosion mechanisms in titanium oxide-based films produced by anodic treatment. **Electrochimica Acta**, v. 234, n°. 20, p. 16-27, 2017.
- ANDRADE, A.D.; MARINHO, C.F.; BARCELOS, M.; ZORZAL, M.B.; CONZ, M.B., JR VIDIGAL, G.M. Bone Biology: the review of literature. **Revista de Implantes**, v. 4, 659-662, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Portaria Interministerial Nº 482, DE 16 DE ABRIL DE 1999. Esterilização por óxido de etileno e reprocessamento.
- ASRI, R.I.M.; HARUN, W.S.W.; SAMYKANO, M.; LAH, N.A.C.; GHANI, S.A.C.; TARLOCHAN, F.; RAZA, M.R. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1251-1274, 2017.
- AYDINOGLU, A.; YORUÇ A.B.H. Effects of silane-modified fillers on properties of dental composite resin. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 382-389, 2017.
- BALLARRE, J. *et al.* Electrochemical evaluation of multilayer silicametacrylate hybrid sol-gel coatings containing bioactive particles on surgical grade stainless steel. **Surface & Coatings Technology**, v. 203, n. 1-2, p. 80- 86, 2008.
- BALLARRE, J.; 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, n. 2, p. 164-172, 2013.
- BALLARRE, J.; 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.

- BALLARRE, J.; 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.
- 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. 17, n 4-1, 2002.
- BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. **Biomater**, v. 3, p. 1-12, 2013.
- BIGGS, M.J.P.; RICHARDS, R.G.; DALBY, M.J. Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 619-633, 2010.
- BINGJING, Z.; HONG, W.; NING, Q.; CHAO W.; MIN, H. Corrosion resistance characteristics of a Ti-6Al-4V alloy scaffold that is fabricated by electron beam melting and selective laser melting for implantation in vivo. **Materials Science & Engineering**, jul. 2016.
- BONN, D.; EGGERS, J.; INDEKEU, J.; MEUNIER, J.; ROLLEY, E. Wetting and spreading. **Reviews of Modern Physics**, v. 81, p. 739-805, 2009.
- BRYANT, M.; NEVILLE, A. Corrosion and mechanical properties. **Orthopaedics and trauma**, v. 30:3, p. 176-191, 2016.
- BUSER, D.; JANNER, S.F.M.; WITTNEBEN, J.-G; BRAGGER, U.; RAMSEIER, C.A.; SALVI, G.E. 10 - Year survival and success rates of 511 Titanium Implants with a Sandblasted and acid-etched surface: A retrospective study in 303 partially edentulous patients. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 14, n. 6, p. 839-851, 2012.
- BUSER, D.; NYDEGGER, T.; OXLAND, T.; COCHRAN, D.L.; SCHENK, R.K.; HIRT, H.P.; SNÉTIVY, D.; NOLTE, L.P. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. **J Biomed Mater Res**, v. 45, n. 2, p. 75-83, 1999.
- BUSER, D.; SCHENK, R.K.S.S.; FIORELLINI, J.P.; FOX, C.H.; STICH, H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **J Biomed Mater Res**, v. 25, n. 7, p. 889-902, 1991.
- 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.
- CARDOSO, H. R. P.; BELTRAMI, V. S.; OLIVEIRA C. T.; MENEZES, T. L.; FERREIRA, J. Z.; MALFATTI, C. F. New sol-gel formulations to increase the barrier effect of a protective coating against the corrosion and wear of galvanized steel. **Materials Research**, v. 18, p. 1439-1516, 2015.

CASSIE, A.; BAXTER, S. Wettability of porous surfaces. **Trans. Faraday Soc.**, v. 40, p. 546-551, 1944.

CATTEAUX, R.; GRATTEPANACHE-LEBECQ, I.; DÉSANGLOIS, F.; CHAI, F.; HORNEZ, J.-C.; HAMPSHIRE, S. *ET AL.* Synthesis, characterization and bioactivity of bioglasses in the Na₂O–CaO–P₂O₅–SiO₂ system prepared via sol gel processing. **Chem. Eng. Res. Des.** v. 91, p. 2420–2426, 2013.

CENGIZ, U.; CANSOY, C.E. Applicability of Cassie–Baxter equation for superhydrophobic fluoropolymer–silica composite films. **Applied Surface Science**, v. 335, p. 99-106, 2015.

CERTHOUX E.; ANSART F.; TURQ V.; BONINO J. P.; SOBRINO J. M.; GARCIA J.; REBY J. New sol-gel formulation to increase the barrier effect of a protective coating against the corrosion of steels. **Progress in Organic Coatings**, v. 76, p. 165-172, 2012.

CHEN, F.M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 86-168, 2016.

CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 87, p. 1-57, jan. 2015.

CHEN, Q.Z.; THOMPSON, I.D.; BOCCACCINI, A.R. 45S5 Bioglass-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, p. 2414-2425, 2006.

CHEN, S; GUO, Y; LIU, R.; WU, S.; FANG, J.; HUANG, B.; LI, Z.; CHEN, Z.; CHEN, Ze; Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 58-69, 2018.

CHIU, K.Y.; WONG, M.H.; CHENG, F.T.; MAN, H.C. Characterization and corrosion studies of titania-coated NiTi prepared by sol–gel technique and steam crystallization. **Appl. Surf. Sci.**, v. 253, p. 6762–6768, 2007.

CHOUDHURY, P.; AGRAWAL, D.C. Sol–gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrates. **Surf. Coat. Technol.**, vol. 206, p. 360–365, 2011.

CHOWDHURY, S.S.; PANDEY, P.R.; KUMAR, R.; ROY, S. Effect of shape of protrusions and roughness on the hydrophilicity of a surface. **Chemical Physics Letters**, v. 685, p. 34-39, 2017.

CHUNG, J.J; FUJITA Y.; LI, S.; STEVENS, M.M.; KASUGA, T.; GEORGIU, T.K; JONES, J.R. Biodegradable inorganic-organic hybrids of methacrylate star polymers for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 54, p. 411-418, 2017.

CREMASCO, A.; MESSIAS, A.D.; ESPOSITO, A.R.; DUEK, E.A.R.; CARAM, R. Effects of alloying elements on the cytotoxic response of titanium alloys. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, p. 833-839, 2011.

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.

- DALBY, M.J.; GADEGAARD, N.; OREFFO, R.O. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. **Nat. Mater.**, v. 13, p. 558 – 569, 2014.
- DENIZOLT GALDINO, A.G.S.; OLIVEIRA, E.M.; FILIPPIN-MONTEIRO, F.B.; ZAVAGLIA, C.A.C. In vitro essay analysis of 50wt.% HA-50wt.% TiO₂ composite prepared by the polymeric sponge method. **Cerâmica**, v. 60, p. 586-593, 2014.
- EL-GHANNAM, A.; DUCHEYNE, P. Bioactive Ceramics. **Comprehensive Biomaterials II**, v. 1, p. 204-234, 2017.
- ELIAS CN, MEIRELLES L. Improving osseointegration of dental implants. **Expert Rev Med Devices**, v. 7, p. 241-256, 2010.
- FERRARIS, S.; VENTURELLO, A.; MIOLA, M.; COCHIS, 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, p. 1-35, 2014.
- 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. A. **Influência do pH 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**. 98 f. 2014. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas , Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- 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, n. 3, p. 397-425, 2009.
- GITTENS, R.A.; MCLACHLAN, T.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; CAI, Y.; BERNER, S.; TANNENBAUM, R.; SCHWARTZ, Z.; SANDHAGE, K.H.; BOYAN, B.D. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. **Biomaterials**, v. 32, p. 3395 – 3403, 2011.
- GODAVITAME, C.; ROBERTSON, A.; PETERS, J.; ROGERS, B. Biodegradable Materials. **Orthopaedics and trauma**, v. 31, p. 316-320, 2017.
- GRAEVE, I.; VEREECKEN, J.; FRANQUET, A.; VAN SCHAFTINGHEN, T.; TERRYN, H. Silane coating of metal substrates: Complementary use of electrochemical, optical and thermal analysis for the evaluation of film properties. **Progress in Organic Coatings**, v. 59, n. 3, p. 224-229, 2007.
- 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.

HALLAB, N.J.; JACOBS, J.J. Chapter II.5.6-Orthopedic Applications. **Biomaterials Science**, p. 841-882, 2013.

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.

HOTCHKISS, K.M.; REDDY, G.B.; HYZY, S.L.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D.; OLIVARES-NAVARRETE, R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. **Acta Biomaterialia**, v. 31, p. 425-434, 2016.

HUANG, Q.; ELKHOOPLY, T.A.; LIU, X.; ZHANG, R.; YANG, X.; SHEN, Z.; FENG, Q. Effects of hierarchical micro/nano-topographies on the morphology, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 37-45, 2016.

IBRAHIM, M.Z.; SARHAN, A.A.D.; YUSUF, F.; HAMDI, M. Biomedical materials and techniques to improve the tribological, mechanical and biomedical properties of orthopedic implants – A review article. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 714, n. 15, p. 636-667, 2017.

ISAAC, J.; GALTAYRIES, A.; KIZUKI, T.; KOKUBO, T.; BERDAL, A.; SAUTIER, J-M. 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.

JONES, J.R.; SEPULVEDA, P.; HENCH, L.L. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 58, p. 720-726, 2001.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. **Biomaterials**, v. 27, p. 2907-2915, 2006.

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.

KUNST, S.R.; 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-A.

KUNST, S.R.; CARDOSO, H.R.P.; BELTRAMI, V. S.; OLIVEIRA C.T.; MENEZES, T.L.; FERREIRA, J.Z.; MALFATTI, C.F. New sol-gel formulations to increase the barrier effect of a protective coating against the corrosion and wear of galvanized steel. **Materials Research**, v. 18, p. 1439-1516, 2015

KUNST, S.R.; KORB, M.A.; MENEZES, T.L.; TESSARO, G.; OLIVEIRA, C.T.; MALFATTI, C. F. Influence of the curing process of the hybrid films on the performance of coatings obtained by epoxy painting. **Metallurgy and Materials**, v. 66, p. 309-316, 2013.

- KUNST, S.R.; LUDWIG, G.A.; VEGA, M.R.; OLIVEIRA, C.T.; MALFATTI, C.F. Corrosion resistance of hybrid films applied on tin plate: Precursor solution acidified with nitric acid (pH=3). **Revista Dyna**, v. 81, n° 188, 2014-B.
- KURELLA, A.; DAHOTRE, N.B. Surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering. **Biomaterials Applications**, v. 20, p. 5-50, 2005.
- LEE, L.C.Y; GADEGAARD, N.; ANDRES, M.C.; TURNER, L-A.; BURGESS, K.V.; YARWOOD, S.J.; WELLS, J.; SALMERON-SANCHEZ, K.; MEEK, D.; OREFFO, R.O.C.; DALBY, M.J. Nanotopografia controla mudanças no ciclo celular envolvidas com auto-renovação de células-tronco esqueléticas e multipotência. **Biomateriais**, v. 116, p. 10-20, 2017.
- LIANG, J.; HU, Y.; WU, H. Facile formation of superhydrophobic silica-based surface on aluminum substrate with tetraethylorthosilicate and vinyltriethoxysilane as co-precursor and its corrosion resistant performance in corrosive NaCl aqueous solution. **Surface e Coatings Technology**, v. 240, p. 145-153, 2014.
- LIU, J.; WANG, X.; WU, B.J.; ZHANG, T.F.; LENG, Y.X.; HUANG, N. Tribocorrosion behavior of DLC-coated CoCrMo alloy in simulated biological environment, **Vacuum**, v. 92, 39-43, 2013.
- MA, J.; CHEN, C.Z.; WANG, D.G.; HU, J.H. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of magnesium-doped sol-gel glass and glass-ceramics. **Ceram. Int.** v. 37, p. 1637-1644, 2011.
- MALAVAL, L.; LIU, F.; ROCHE, P.; AUBIN, J.EJ. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. **J Cell Biochem. Cell. Biochem.**, v. 74, p. 616 - 627, 1999.
- MANAM, N.S.; HARUN, W.S.W.; SHRI, D.N.A.; GHANI, S.A.C.; KURNIAWAN, T.; ISMAIL, M.H.; IBRAHIM, M.H.I. Study of corrosion in biocompatible metals for implants: A review. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 701, p. 698-715, 2017.
- MATHEW, M.T. *et al.*, Influence of pH on the tribocorrosion behavior of CpTi in the oral environment: synergistic interactions of wear and corrosion, **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, v. 100, p.1662-1671, 2012.
- MOHAMMADLOOA, H.E.; SARABI, A.A.; ALVANI, A.A.S.; SAMEIEA, H.; SALIMIA, R. Nano-ceramic hexafluorozirconic acid based conversion thin film: Surface characterization and electrochemical study. **Surface e Coatings Technology**, v. 206, p. 4132-4139, 2012.
- MORAVEC, H.; VANDROVCOVA. M.; CHOTOVA, K.; FOJT, J.; PRUCHOVA, E.; JOSKA, L.; BACAKOVA, L. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 65, p. 313 - 322, 2016.
- MOZAFARI, M.; RABIEE M.; AZAMI M.; MALEKNIA S. Biomimetic formation of apatite on the surface of porous gelatin/bioactive glass nanocomposite scaffolds. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 1740-1749, 2010.

MURUGAN, N.; KAVITHA, L.; SHINYJOY, E.; RAJESWARID.; VIMALA, K.; KANNAN, S.; GOPI, D. Smart rose flower like bioceramic/metal oxide dual layer coating with enhanced anti-bacterial, anti-cancer, anti-corrosive and biocompatible properties for improved orthopedic applications. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 85831-85844, 2015.

NAYAK, J.P.; KUMAR, S.; BERA, J.; Sol-gel synthesis of bioglass-ceramics using rice husk ash as a source for silica and its characterization. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, p. 447-1451, 2010

NIINOMI, M.; NAKAI, M.; HIEDA, J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. **Acta Biomater**, v. 8, p. 3888, 2012.

NOVAES, A.B.J.; SOUZA, S.L.; DE OLIVEIRA, P.T.; SOUZA, A.M. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, n. 3, p. 377-383, 2002.

OLIVARES-NAVARRETE, R.; RODIL, S.E.; HYZY, S.L; DUNN, G.R.; ALMAGUER-FLORES, A.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Role of Integrin Subunits in Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Osteoblast Maturation on Graphitic Carbon-coated Microstructured Surfaces. **Biomaterials**, v. 51, p. 69 – 79, 2015.

OLIVEIRA, L.S. DE A.F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A.P.L.; ROSA, F.P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Rev. Ciênc. Médicas E Biológicas**, v. 9, p. 37-44, 2010.

OOIJ, W.J.V.; ZHU, D.; STACY, M.; SETH, A.; MUGADA, T.; GANDHI, J.; PUOMI, P. Corrosion Protection Properties of Organofunctional Silanes – An Overview. **Tsinghua Science & Technology**, v. 10, n. 6, p. 639-664, 2005.

OWENS, G. J.; SINGH, R. K.; FOROUTAN, F.; ALQAYSI, M.; HAN, C.-M.; MAHAPATRA, C.; KIM, H.-W.; KNOWLES, J. C. Sol-gel based materials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 77, p. 1-79, abr. 2016.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. Washington: Cengage Learning, 2011, 687 p.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, p. 957-971, 2015.

POPAT, K.C.; ELTGROTH, M.; LATEMPA, T.J.; GRIMES, C.A.; DESAI, T.A. Titania nanotubes: a novel platform for drug-eluting coatings for medical implants. **Small**, v. 3, p. 1878 - 1881, 2007.

PRADO, R.F.; OLIVEIRA, F.S.; NASCIMENTO, R.D.; VASCONCELLOS, L.M.R.; CARVALHO, Y.R.; CAIRO, C.A.A. Osteoblast response to porous titanium and biomimetic surface: In vitro analysis. **Materials Science and Engineering: C**, v. 52, p. 194-203, 2015.

PUNT, I.M. *et al.* Complications and reoperations of the sb charité lumbar disc prosthesis: experience in 75 patients. **European spine journal**, v. 17, p. 36-43, 2008.

- QU, Z.; RAUSCH-FAN, M.; WIELAND, M.; MATEJKA, M.; SCHEDLE, A. Roughened titanium surfaces with silane and further RGD peptide modification in vitro. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 2713-2722, 2013.
- 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.C.; PACHA-OLIVENZA, M.A.; CRESPO, L.; SALDAÑA, L.; VILABOIA, N.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M. L.; BABIANO, R. Controlled silanization-amination reactions on the Ti6Al4V surface for biomedical applications. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 106, p. 248-257, 2013.
- ROMAGNOLI, C; D'ASTA, F; BRANDI, M. Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. **Clinical cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 10, p. 155-161, 2014.
- ROMANO, A.P.; FEDEL, M.; DEFLORIAN, F.; OLIVIER, M.G. Silane sol-gel film as pretreatment for improvement of barrier properties and filiform corrosion resistance of 6016 aluminium alloy covered by cathodic coating. **Progress in Organic Coatings**, v. 72, p. 695-702, 2011.
- ROSA MB, ALBREKTSSON T, FRANCISCHONE CE, FILHO HO, WENNERBERG A. Micrometric characterization of the implant surfaces from the five largest companies in Brazil, the second largest worldwide implant market. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 28, p. 358-365, 2013.
- SAHA, S.; KUMAR, R.; PRAMANIK, K.; BISWAS, A. Interaction of osteoblast -TiO₂ nanotubes in vitro: The combinatorial effect of surface topography and other physico-chemical factors governs the cell fate. **Applied Surface Science**, v. 449, p. 152-165, 2018.
- 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.
- SALVADOR, D.G.; MARCOLIN, P.; BELTRAMI, L. R.; BRANDALISE, R. N.; KUNST, S. R. Influences of pre-treatment and curing of alkoxysilanes in protecting the Ti-6Al-4V alloy. **Journal of applied polymer science (online)**, 2017.
- SALVADOR, D.G.; MARCOLIN, P.; BELTRAMI, L.V.R.; BRANDALISE, R.N.; KUNST, S.R. Development of Alkoxide Precursors-Based Hybrid Coatings on Ti-6Al-4V Alloy for Biomedical Applications: Influence of pH of Sol. **Journal of Materials Engineering and Performance**, v. 27, p. 1-12, 2018.
- SAVARIS M.; BRANDALISE, R.N.; SANTOS, V. Influence of different sterilization processes on the properties of commercial poly(lactic acid). **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems (Print)**, v. 69, p. 661-667, 2016.

- SEPULVEDA, P.; JONES, J.R.; HENCH, L.L. In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.61, p. 301-311, 2002,
- SHENG, Y.-J.; JIANG, S.; TSAO, H.-K. Effects of geometrical characteristics of surface roughness on droplet wetting. **The Journal of chemical physics**, v. 127, 2007.
- SHI, S.F.E.; GUO, Z.G.; LIU, W.M. The recent progress of tribological biomaterials. **Biosurface and biotribology**, v. 1, p. 81-97, 2015.
- SILVA-BERMUDEZ, P.; RODIL, S. E., An overview of protein adsorption on metal oxide coatings for biomedical implants, **Surf. Coatings Technol.**, v. 233, p.147-158, 2013.
- SJOSTROM, T.; BRYDONE, A.S.; MEEK, R.D.; DALBY, M.J.; SU, B.; MCNAMARA, L.E. Titanium nanofeaturing for enhanced bioactivity of implanted orthopedic and dental devices. **Nanomedicine**, v. 8, p. 89 - 104, 2013.
- SLEPIČKA, P.; MICHALJANIČOVÁ, I.; RIMPELOVÁ, S.; ŠVORČÍK, V. Surface roughness in action – Cells in opposition. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 818-826, 2017.
- SOUZA, M. T., PEITL, O., ZANOTTO, E. D. (2013). Composição Vítrea, Fibras e Tecidos Vítreatos Bioativos e Artigos. **Patente de inovação**. PCT: BR2014/000275, 2013.
- SOUZA, M.T. **Desenvolvimento e caracterização de tecidos vítreos flexíveis altamente bioativos**. 254f. 2015. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Carlos, São Carlos, 2015.
- STANSBURY, E.; BUCHANAN, R. **Fundamentals of electrochemical corrosion**. 1st edn. Ohio: ASM International, 2000.
- SU, Y.; LUO, C.; ZHANG, Z.; HERMAWAN, H.; ZHU, D.; HUANG, J.; LIANG, Y.; LI, G.; REN, L. Bioinspired surface functionalization of metallic biomaterials. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, 2017.
- VARIOLA, F.; YI, J.; RICHERT, L.; WUEST, J.D.; ROSEI, F.; NANCI, A. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. **Biomaterials**, v. 29, p.1285-1298, 2008.
- VERONESI, F.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; LONGO G.; IOANNIDU, C.A.; D'ABUSCO, A.S.; SUPERTI, F.; PANZINI, G.; MISIANO, C.; PALATTELLA, A.; SELLERI, P.; GIROLAMO, N. D.; GARBARINO, V.; POLITI, L.; SCANDURRA, R. Osseointegration is improved by coating titanium implants with a nanostructured thin film with titanium carbide and titanium oxides clustered around graphitic carbon. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 264-271, 2017.
- 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.

WANG, N.; XIONG, D. Comparison of micro-/ nano-hierarchical and nano-scale roughness of silica membranes in terms of wetting behavior and transparency. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 446, p. 8-14, 2014.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 25, p. 63-74, 2010.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, p. 172-184, 2009.

YANG, K.; REN, Y. Nickel-free austenitic stainless steels for medical applications, **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 11, 2010.

YANG, L.; ZHANG, M.; SHI, S.; LV, J.; SONG, X.; HE, G.; SUN, S. Effect of annealing temperature on wettability of TiO(2) nanotube array films. **Nanoscale Res. Lett.**, v. 9, p. 621, 2014.

YEH, J. M. *et al.* Anticorrosively enhanced PMMA-SiO₂ hybrid coatings prepared from the sol-gel approach with MSMA as the coupling agent. **Surface & Coatings Technology**, v. 201, n. 3-4, p. 1788-1795, 2006.

ZANOTTO, E.D.; PEITL, O.F.; CHINAGLIA, C.R. Processo de recobrimento descontínuo utilizando um biomaterial bioabsorvível e bioativo aplicado sobre substratos sólidos, recobrimento descontínuo e seu uso. US Pat. WO2015123749A1, 2015.

ZAREIDOOST, A.; YOUSEFPOUR, M.; GHASEME, B.; AMANZADEH, A. The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 23, p. 1479-1488, 2012.

ZHELUDKEVICH, M.L.; SERRA, R.; MONTEMOR, M.F.; SALVADO, I.M.; FERREIRA M.G.S. Corrosion protective properties of nanostructured sol-gel hybrid coatings to AA2024-T3. **Surface e Coatings Technology**, v. 200, p. 3084-3094, 2006.

ZOMORODIAN, A.; BRUSCIOTT, F.I; FERNANDES, A.; CARMEZIM, M.J.; MOURA, T.; SILVA, T.; FERNANDES, J.C.S.; MONTEMOR, M.F. Anti-corrosion performance of a new silane coating for corrosion protection of AZ31 magnesium alloy in Hank's solution. **Surf. Coat. Technol.**, v. 206, p. 4368-4375, 2012.