

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia



Tese

**Revestimentos biomiméticos para superfície de titânio em aplicações
biomédicas**

José Carlos Bernedo Alcázar

Pelotas, 2017

José Carlos Bernedo Alcázar

“Revestimentos biomiméticos para superfície de titânio em aplicações biomédicas”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de concentração Materiais Odontológicos.

Orientador: Prof. Dr. Neftali Lenin Villarreal Carreño

Co-Orientador: Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A349r Alcázar, José Carlos Bernedo

Revestimentos biomiméticos para superfície de titânio em aplicações biomédicas / José Carlos Bernedo Alcázar ; Neftali Lenin Villarreal Carreño, orientadora ; Sandra Beatriz Chaves Tarquínio, coorientadora. — Pelotas, 2017.

217 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Titânio. 2. Revestimento de superfícies biomiméticas. 3. Sol-gel dip coating. 4. Polarização catódica eletroquímica. I. Carreño, Neftali Lenin Villarreal, orient. II. Tarquínio, Sandra Beatriz Chaves, coorient. III. Título.

Black : D151

Elaborada por Fabiano Domingues Malheiro CRB: 10/1955

“Revestimentos biomiméticos para superfície de titânio em aplicações biomédicas”

"Dissertação (ou Tese) apresentada (ou aprovada), como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre (ou Doutor) em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas"

Banca Examinadora

Prof. Dr. Neftali Lenin Villarreal Carreño
Presidente da Banca - Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund
Membro da Banca -Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Fernanda Nedel
Membro da Banca -Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Giana Lima
Membro da Banca -Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. José Henrique Alano
Membro da Banca -Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Claudio Pereira
Membro Suplente da Banca- -Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rafael Moraes
Membro Suplente da Banca- -Universidade Federal de Pelotas

Primeiramente, a Deus nosso senhor, pela saúde e força nestes anos todos, e pela oportunidade concedida, que permitiu e permite o desenvolvimento da minha formação profissional e pessoal.

A minha esposa, meus pais e a minha família no Perú, por estarem sempre ao meu lado, incondicionalmente. Mesmo com todas as dificuldades, como a distância e o afastamento de anos, sempre me incentivaram a continuar com meus sonhos e responsabilidades.

A meus amigos representadas pelas famílias Demarco (Flavio, Sandra, Giovana, Gulia), Lamas (Ney, Rita, Isabel, Eulália e Juliana), Carreño (Neftali e Leidne, Vitor e Catharina), por todos o momento reconfortantes graças a vocês sempre me senti em família.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, **UFPeI**, e Faculdade de Odontologia.

À **Prof. Dr. Rafael Moraes**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Neftali Lenin Villarreal Carreño**, pelo suporte, e ser a pessoa presente, humana acima de tudo. Agradeço pela parceria, conselhos, e oportunidades ao longo desta longa jornada.

À minha co-orientadora **Profª. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio**, pela dedicação, conhecimentos e confiança depositada em mim. Principalmente, por representar uma figura importante e competente.

Aos **professores, colegas e amigos** do Programa de Pós-graduação em Odontologia e Engenharia de materiais da UFPEL. Em especial, **Fernanda Nedel, Marcus Conde e Luis Alexandre Chisini**.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado a todos (a)!

Notas Preliminares

A presente Dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006. Informações disponíveis no site: (http://prg.ufpel.edu.br/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf), adotando o Nível de Descrição 4 – Estruturas em Artigos, que consta no Apêndice D do referido manual.

RESUMO

ALCÁZAR, José Carlos Bernedo. **“Revestimentos biomiméticos para superfícies de titânio em aplicações biomédicas”**. 217 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A osteointegração produto de próteses ósseas de titânio, continua sendo um ponto crítico e problemático recorrente no processo de reabilitação. Esforços para aperfeiçoar a resposta na interface "superfície-célula" dos implanto-materiais, têm sido direcionados para melhorar as propriedades físico-químicas das superfícies e induzir a adesão, proliferação, diferenciação ou apoptose celular. Revestimentos biomiméticos com superfícies sensíveis em titânio representam alternativas com resultados promissores para a resposta celular promovendo a formação de uma conexão funcional entre a superfície do material e o tecido ósseo. Para abordar esse tema foram realizados uma revisão sistemática relacionado ao tema e um estudo laboratorial para determinar as características de revestimentos de superfície biomiméticas (biomoléculas) em titânio e respostas celulares em relação à. No primeiro artigo foi realizada uma revisão sistemática para avaliar a resposta celular produzida pelo tratamento de superfícies de titânio mediante o uso da técnica de polarização catódica. Treze estudos foram cumpriram com os critérios de inclusão e foram incluídos na revisão. Os resultados in vitro e in vivo relataram que o uso de polarização catódica promoveu superfícies com hidride e deposição efetiva e adesão das biomoléculas revestidas. O método eletroquímico, promoveu maior ou comparável viabilidade celular, proliferação, adesão, diferenciação ou crescimento ósseo. Para os artigos 2 e 3, foram desenvolvidos revestimentos de superfícies biomiméticas pelas técnicas de sol-gel dip-coating e polarização eletroquímica com diferentes configurações de superfícies estímulo responsivas multicamada e combinação de biomoléculas em titânio. O desenvolvimento das superfícies foi realizado e as amostras foram caracterizadas mediante microscopia de Força Atômica, Análise de Raios X de Energia Dispersa e citotoxicidade. A análise estatística foi descritiva e analítica (Stata 11.0). Os resultados foram submetidos a análise de variância ANOVA e/ou teste de Kruskal Wallis com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$). No artigo 2, os resultados demonstraram que o grupo de superfícies modificadas com TiO_2 : Li^+ (15%): Zr (15%)/PEG mediante o método sol-gel dip coating, promoveu maior crescimento celular ($p > 0,05$) comparado ao resto dos grupos experimentais. No artigo 3, os resultados demonstraram que o grupo de superfícies modificadas com Indium tin oxide ($\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$) mediante o método sol-gel dip coating, promoveu alto crescimento celular comparável estatisticamente ao grupo controle ($p > 0,05$) e que o grupo que usou a técnica de polarização catódica promoveu crescimento celular. A polarização catódica promove alta viabilidade celular. In vitro, a técnica sol-gel e de polarização eletroquímica modificaram as superfícies de titânio. Entre as biomoléculas ativas, $\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$ e TiO_2 : Li^+ (15%):Zr(15%)/PEG aumentaram a viabilidade celular.

Palavras chave: titânio; revestimento de superfícies biomiméticas, sol-gel dip coating, polarização catódica eletroquímica

ABSTRACT

ALCÁZAR, José Carlos Bernedo. "**Biomimetic coatings of titanium surfaces for biomedical applications**" 217 p. Thesis project (Doctorate) - Post- Graduate Program of Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

Osseointegration product of titanium bone prostheses continues to be a recurring and problematic point in the rehabilitation process. Efforts to improve the response in the interface "surface-cell" of implant-materials have been address to enhance physicochemical properties of the surfaces and induce cellular adhesion, proliferation, differentiation or apoptosis. Biomimetic coatings with titanium sensitive surfaces represent alternatives with promising results for the cellular response to osseointegration and can stimulate positive biological responses, promoting the formation of a functional connection between the surface of the material and the bone tissue, producing sufficient stimuli in the vascularization for the performance of tissue metabolic changes. To address this theme, a systematic review on the subject and a laboratory study were carried out to determine the characteristics of titanium biomimetic surface coatings (biomolecules) and the cellular responses. In the first article, a systematic review was carried out to evaluate the cellular response produced by the treatment of titanium surfaces using the cathodic polarization technique. Thirteen studies accomplished the inclusion criteria and were included in the review. In vitro and in vivo results reported that the use of cathodic polarization promoted surfaces with hydride and effective deposition and adhesion of the coated biomolecules. The electrochemical method promoted higher or comparable cellular viability, proliferation, adhesion, differentiation or bone growth than the group's control. For articles 2 and 3, biomimetic surface coatings were developed by integrated dip-coating sol-gel techniques and electrochemical polarization with different configurations of multilayer responsive stimulus surfaces and combination of biomolecules in titanium. Surface development was performed and Atomic Force Microscopy, Dispersed Energy X-ray Analysis and cytotoxicity, characterized the samples. The statistical analysis was descriptive and analytical (Stata 11.0). The results were submitted to the analysis of variance ANOVA and/or Kruskal Wallis test to determine possible differences between the groups with a significance level of 5% ($p \leq 0.05$). In article 2, the results showed that the group of modified surfaces with TiO_2 : Li + (15%): Zr (15%)/ PEG by the sol-gel dipcoating method, promoted higher cell growth ($p > 0.05$) than the rest of the experimental groups. In article 3, the results showed that the group of surfaces modified with Indium tin oxide ($\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$) by the sol-gel dip coating method promoted high cell growth statistically comparable to the control group ($p > 0.05$) and the group that used the cathodic polarization technique promoted cell growth. Cathodic polarization promotes high cell viability and bone growth. In vitro, the sol-gel dip coating technique and electrochemical polarization modified titanium surfaces. Among the active biomolecules, $\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$ and TiO_2 : Li^+ (15%): Zr (15%) / PEG increased cell viability.

Key words: titanium; coating of biomimetic surfaces; sol-gel dip coating; electrochemic cathodic polarization.

Lista de figuras

Projeto

Figura1 Fluxograma da preparação e caracterizações de superfícies biomiméticos-titânio	40
Figura 2 Grupos experimentais das etapas do estudo	40

Relatório de Campo

Figura 1 Fluxograma da preparação e caracterizações de superfícies biomiméticos - Ti	63
Figura 2 Grupos experimentais das etapas do estudo.....	64
Figura 3 Confeção dos corpos de prova de titânio	67
Figura 4 Fluxograma de pré-tratamento polimento mecânico.....	69
Figura 5 Corpos de prova após pré-tratamento de polimento mecânico e revestimento	70
Figura 6 Fluxograma de pré-tratamento de superfícies por ataque ácido.....	72
Figura 7 Micrografia da liga titânio sim tratamento à magnificação de 1500X.....	73
Figura 8 Micrografia da liga titânio polimento mecânico e ataque ácido à magnificação de 1500X.....	73
Figura 9 Manipulação dos corpos de prova sob N gás após ataque ácido.....	74
Figura 10 Fluxograma da síntese do sol-gel de ZrO_2/PEG e dip coating	78
Figura 11 Processo de preparação de sol de ZrO_2 / PEG	78
Figura 12 Corpos de prova de TI F67 GR2 substratos revestidos ZrO_2/PEG	79
Figura 13 Fluxograma da síntese do sol-gel de TiO_2/PEG e dip coating.....	80
Figura 14 Fluxograma da síntese do sol-gel de $TiO_2: Li^+ (15\%): Zr (15\%)/PEG$. ..	82
Figura 15 Fluxograma da síntese do sol-gel de $TiO_2: Li (15\%)/PEG$ e dip coating. ..	84
Figura 16 Fluxograma da síntese do sol-gel de ITO e dip coating.....	86
Figura 17 Sóis para preparação dos revestimentos biomiméticos.....	87
Figura 18 Fluxograma da síntese de sol-gel de $ZrO_2: Li^+ (15\%)/PEG$ e dip coating	88
Figura 19 Fluxograma da síntese de sol-gel de $ZrO_2: Li^+ (15\%): Sr (15\%)/PEG$ e dip coating.....	90

Figura 20 Características da célula Eletroquímica para 5 eléctrodos.....	93
Figura 21 Fluxograma do processo de polarização catódica pH 3/ 1,6 mA/cm ² ..	94
Figura 22 Micrografia da liga titânio após polarização catódica à magnificação de 1000XO2 e 1500XOI2 (Ph: Fase de contraste).	96
Figura 23 Esquematização dos ensaios de polarização catódica.....	97
Figura 24 P1 - AFM (1µm) polarização catódica (CH ₃ COOH- C ₂ H ₃ NaO ₂) / 1,6 mA/cm ²	101
Figura 25 P1- AFM (2µm) polarização catódica (CH ₃ COOH- C ₂ H ₃ NaO ₂) / 1,6 mA/cm ²	101
Figura 26 P1- AFM (1µm) polarização catódica (CH ₃ COOH- C ₂ H ₃ NaO ₂) / 1,6 mA/cm ²	102
Figura 27 P1-AFM (2µm) polarização catódica (CH ₃ COOH- C ₂ H ₃ NaO ₂)/1,6 mA/cm ²	102
Figura 28 G1- AFM 1µm do revestimento de ZrO ₂ /PEG [0,2 M].....	103
Figura 29 G1- AFM 2µm do revestimento de ZrO ₂ /PEG [0,2 M].....	103
Figura 30 G2- AFM 1µm do revestimento de TiO ₂ /PEG [0,2 M]	104
Figura 31 G2- AFM 2µm do revestimento de TiO ₂ /PEG [0,2 M].....	104
Figura 32 G2- AFM 1µm do revestimento de TiO ₂ /PEG [0,2 M]	105
Figura 33 G2- AFM 2µm do revestimento de TiO ₂ /PEG [0,2 M]	105
Figura 34 G3- AFM 1µm do revestimento de TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%): Zr (15%)/PEG.....	106
Figura 35 G3- AFM 2µm do revestimento de TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%): Zr (15%)/PEG.....	106
Figura 36 G3- AFM 1µm do revestimento de TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%): Zr (15%)/PEG....	107
Figura 37 G3- AFM 2µm do revestimento de TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%): Zr (15%)/PEG.....	107
Figura 38 G4- AFM 1µm do revestimento de TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG.....	108
Figura 39 G4- AFM 2µm do revestimento de TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG.....	108
Figura 40 G4- AFM 1µm do revestimento de TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG.....	109
Figura 41 G4- AFM 2µm do revestimento de TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG.....	109
Figura 42 G2-V2 AFM 1µm do revestimento de ZrO ₂ /PEG [2 M]	110
Figura 43 G2-V2 AFM 2µm do revestimento de ZrO ₂ /PEG [0,2 M]	110

Figura 44 GHOP1- AFM 1µm do revestimento de ZrO ₂ /PEG [0,2 M].....	111
Figura 45 GHOP2- AFM 1µm do revestimento de ZrO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG..	111
Figura 46 GHOP2 - AFM 2µm do revestimento de ZrO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG.	112
Figura 47 GHOP3 - AFM 1µm do revestimento de ZrO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%): Sr (15%)/PEG.....	112
Figura 48 GHOP3 - AFM 1µm do revestimento de ZrO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%): Sr (15%)/PEG.....	113
Figura 49 Fluxograma de adesão Celular em Ensaio MTT sob superfície de titânio.....	115
Figura 50 Teste de citotoxicidade com amostras de revestimentos biomiméticos-Ti com diferentes técnicas.....	117
Figura 51 Teste de citotoxicidade dos revestimentos pelo processo sol-gel dip coating com diferentes sóis.....	118
Figura 52 Teste de citotoxicidade dos revestimentos pelo processo sol-gel dip coating e polarização eletroquímica.....	119
Figura 53 Teste de citotoxicidade dos corpos de prova pelo pré-tratamentos....	120

Artigo 1

Figura 1 Flowchart information of the different phases of papers search and selection.....	147
Figura 2 Risk according to the study design	148

Artigo 2

Figura 1 Flow chart of different hybrid systems by sol synthesis.....	171
Figure 2. AFM analysis of experimental modified titanium in-group G1 (ZrO ₂ /PEG [2 M]). A. Distance 1µm B. Distance 2µm.....	171
Figure 3. AFM analysis of experimental modified titanium in group G2 (TiO ₂ /PEG [2 M]). A. Distance 1µm B. Distance 2µm.....	171
Figure 4. AFM analysis of experimental modified titanium in group G3 (TiO ₂ [2 M]: Li ⁺ (15%): Zr (15%)/PEG). A. Distance 1µm B. Distance 2µm.....	172

Figure 5. AFM analysis of experimental modified titanium in group G4 (TiO_2 [2 M]: Li^+ (15%)/PEG). A. Distance $1\mu\text{m}$ B. Distance $2\mu\text{m}$	172
Figure 6. Cell viability observed in experimental groups of Titanium disks coated by different sol solutions using the sol-gel dip coating method (G1,G2,G3,G4) and control group (GC) without sol solutions.....	172
Figure 7. Appearances of sol-gel sols (G1, G2, G3, G4)	173
Figure 8. Appearances of titanium treated after dip coating methods.....	173

Artigo 3

Figure 1 Flow chart of ITO and ZrO_2 /PEG coated synthesized by sol-gel Dip-coated and hydride by Cathodic Polarization.....	189
Figure 2. Cell viability of the experimental Titanium modified surfaces by sol-gel dip coating method and different sol solutions (G2, G5, G6) and cathodic electrochemical polarization (P1) and the control group (GC).....	190
Figure 3. A. Sol of ITO, B. Sol of ZrO_2 /PEG [2 M] C. Titanium after dip coating method with ITO.....	191

Lista de Tabelas

Relatório de Campo

Tabela 1 Resumo grupos experimentais e as condições de deposição dos revestimentos pelo processo sol-gel dip-coating e polarização catódica sobre superfícies de Ti.....	65
Tabela 2 Materiais utilizados no pré-tratamento polimento mecânico.....	68
Tabela 3 Materiais utilizadas no pré-tratamento correção ácida.....	71
Tabela 4 Materiais utilizados para preparação dos sóis para os revestimentos-Ti.	77
Tabela 5 Materiais utilizados para do processo de polarização catódica.....	92
Tabela 6 Descrição dos grupos experimentais pelo processo eletroquímico.....	95
Tabela 7 Análise quantitativa de EDX dos elementos presentes nas superfícies de titânio revestidas com materiais híbridos.....	99
Tabela 8 Materiais utilizados para cultura celular e Ensaio MTT.....	114
Tabela 9 Dados descritivos de acordo com cada grupo e etapa estudado.....	117
Tabela 10 ANOVA para comparações entre os grupos experimentais etapa 1...	118
Tabela 11 Descrição dos grupos experimentais da etapa 1.....	118
Tabela 12 Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos G experimentais (GC, G2, G5, G6, P1) e teste de Dunn para comparações entre grupos da etapa 2.....	119
Tabela 13 Descrição dos grupos experimentais da etapa 2.....	119
Tabela 14 ANOVA para comparações entre os diferentes grupos estudados etapa 3 G (G0, G1, G2, G3, G4, G5).....	119
Tabela 15 Descrição dos grupos experimentais da etapa 3.....	119

Artigo 1

Table 1. Quality assessment according to ARRIVE and SYRCLE criteria.....	141
Table 2. Quantitative results of ARRIVE according to the 20 evaluated items....	144
Table 3. Surface properties and cellular responses from in vitro and in vivo-animal model studies	145

Artigo 2

Table 1 EDX quantitave analysis of the experimental coated Titanium surface...	170
Table 2 ANOVA for comparisons between the experimental groups (G1, G2, G3, G4, GC).....	170

Artigo 3

Table 1 EDX quantitave analysis of the experimental coated Titanium surfaces	187
Table 2 ANOVA for comparisons between the experimental groups (G1, G2, G3, G4, GC).....	187

Lista de Quadros

Projeto

Quadro 1 Cronograma previsto projeto de Doutorado.....	40
Quadro 2 Orçamento de materiais e reagentes.....	41
Quadro 3 Orçamento detalhado de reagentes do trabalho laboratorial.....	42
Quadro 4 Definição de grupos experimentais.....	43

Lista de Abreviaturas e Siglas

ASCs	Células-Tronco Adultas (Adult or Postnatal Stem Cells)
BMP	Proteínas morfogenética óssea
BMP-2	Proteína Morfogenética Óssea 2 (Bone morphogenetic protein 2)
Ca	Cálcio
CaP	Fosfato de cálcio
DRX	Difração de Raios-X
EDS	Microanálise de raios-X por espectroscopia de energia dispersiva
EDX	Espectrômetro de dispersão de energia de raios X
ESCs	Células-Tronco Embrionárias (Embryonic Stem Cells)
FITR	Espectroscopia de infravermelho
HA	Hidroxiapatita
iPSCs	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (Induced Pluripotent Stem Cells)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
P	Fosfato
SIMS	Espectrometria de massas de íons secundários (Secondary Ion Mass Spectroscopy)
TGF-b1	Fator De Crescimento Transgênico Beta 1 (Transforming growth factor beta 1)
TGFβ	Fator de transformação do crescimento beta (Transforming growth factor beta)

Sumário

1. Introdução.....	21
1.1. Objetivos	24
1.1.1. Objetivo geral	24
1.1.2. Objetivos específicos.....	24
1.2. Hipótese	24
2. Revisão de Literatura	26
2.1.1. Biomateriais, titânio e suas propriedades na osseointegração.....	26
2.1.2. Fisiologia óssea, células ósseas e células tronco dentarias	28
2.1.3. Biomoléculas.....	29
2.1.4. Técnicas de tratamento de superfície de implantes de titânio	30
2.1.5. Técnicas de caracterização	31
2.1.5.1. Microscopia eletrônica de varredura	31
2.1.5.2. Microanálise de raios-X por espectroscopia de energia dispersiva	32
2.1.5.3. Difração de Raios-X.....	33
3. Projeto de Pesquisa	34
3.1. Introdução/Justificativa	34
3.2. Objetivos	35
3.2.1. Objetivos geral	35
3.2.2. Objetivos específicos.....	35
3.3. Hipótese	36
3.4. Material e Métodos	36
3.4.1. Preparação das amostras e caracterizações.....	36
3.4.1.1. Método sol-gel dip-coating.....	37
3.4.1.2. Método Eletroquímico.....	38
3.4.1.3. Caracterização química e microestrutural das amostras	38

3.4.2.	Avaliação da biocompatibilidade “ <i>In Vitro</i> ”	38
3.5.	Orçamento	42
3.6.	Cronograma.....	43
3.7.	Descrição em detalhe do orçamento dos reagentes do trabalho laboratorial.....	44
3.8.	Grupos experimentais.....	46
4.	Relatório do trabalho de campo	63
4.1.	Modificações no Projeto de Pesquisa	63
4.2.	Relatório do Trabalho de Campo.....	63
4.2.1.	Desenvolvimento da Pesquisa laboratorial	64
4.2.1.	Preparação corpos de prova de titânio pelo pré-tratamento de polimento mecânico .	69
4.2.2.	Preparação amostras de titânio pelo pré-tratamento correção ácida.....	72
4.2.3.	Síntese dos Sóis para a obtenção dos revestimentos biomiméticos	77
4.2.3.1.	A Síntese e o Processo Sol-Gel.....	77
4.2.3.2.	Fundamentos do processo de Dip-Coating	78
4.2.3.3.	Materiais para a síntese dos sois e a deposição <i>dip coating</i>	78
4.2.3.3.1.	Síntese do Sol de ZrO ₂ /PEG e <i>dip coating</i>	79
4.2.3.3.2.	Síntese do sol TiO ₂ /PEG e dip coating	82
4.2.3.3.3.	Síntese do Sol de TiO ₂ : Li ⁺ (15%): Zr (15%)/PEG e <i>dip coating</i>	83
4.2.3.3.4.	Síntese de Sol de TiO ₂ : Li ⁺ (15%)/PEG e dip coating	85
4.2.3.3.5.	Síntese de Sol de ITO e dip coating	87
4.2.3.3.6.	Síntese de Sol de ZrO ₂ [2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG e dip coating.....	89
4.2.3.3.7.	Síntese de Sol de ZrO ₂ [2 M]: Li ⁺ (15%): Sr (15%)/PEG e dip coating.....	91
4.2.4.	Técnicas eletroquímicas.....	93
4.2.4.1.	Polarização Catódica	93
4.2.4.2.	Parte experimental polarização catódica	94
4.2.4.3.	Ensaio eletroquímico polarização catódica.....	94
4.2.5.	Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva	99
4.2.6.	Microscopia de Força Atômica, rugosidade e Topografia.....	101

4.2.7.	Testes de citotoxicidade.....	114
4.2.7.1.	Cultura de células.....	114
4.2.7.2.	Adesão Celular em Ensaio MTT.....	115
5.	Artigo 1.....	122
6.	Artigo 2.....	150
7.	Artigo 3.....	175
8.	Conclusões.....	191

1. Introdução

Atualmente, 85% da população mundial apresenta necessidade de algum tipo de reparo ou restituições na região craniofacial (SCHELLER; VILLA-DIAZ; KREBSBACH, 2012). A perda dental, doença periodontal (GAMONAL; LOPEZ; ARANDA, 1998), trauma dental (AWS; RUPERT; SERPIL, 2012), doença cárie, desordens fisiológicos ósseos, osteoporoses e câncer são alguns dos fatores responsáveis de desordens craniomaxilofaciais (BEPPU et al., 2011). Desordens craniomaxilofaciais podem afetar uma porção significativa de população, de diferentes faixas etárias (EASTOE, 1968, GHADA et al., 2008, INES et al., 2010). Na área odontológica, estima-se que 35% da população mundial é desdentada (PETERSEN; YAMAMOTO, 2005). Na população brasileira a necessidade de prótese dental foi identificada em 86,3% aos 15 anos e 29,7% aos 24 anos de idade (CORREA et al., 2010, SB, 2012). Soma-se a isto, a crescente tendência mundial projetada da população idosa e a prevalência de osteoporose nesta população (EMAMI et al., 2012). Na população adulta (35 - 44 anos) e idosa (65- 74 anos), 68,8% e 54,7% respectivamente, necessitam da reposição de um ou mais dentes ou são edêntulos (EMAMI, et al., 2012, SB, 2010). Apesar do edentulismo não ser uma condição que represente risco de morte, exerce um impacto crucial na qualidade de vida dos indivíduos afetados. Além do prejuízo na função mastigatória, a perda dental proporciona problemas desordem nutricional, afeta a fonação, a estética (ELENI, 2009, GUIDO et al., 2003), e promove limitações de interação social (GUIDO, et al., 2003, INES, et al., 2010). Os implanto-dispositivos de ligas metálicas, materiais sintéticos restauradores e protéticos utilizados atualmente, apesar de apresentarem uma considerável taxa de sucesso e possuírem relativo baixo custo, estes não são capazes de induzir a regeneração da parte afetada tais como ossos maxilares, próteses do quadril ou vasos sanguíneos do organismo receptor em cenários onde existem mudanças como quantidade e qualidade óssea, doenças sistêmicas, periodontite crônica ou tabagismo especialmente em pessoas com idades avançadas, sendo que estes fatores são determinantes na falha ou rejeição dos implanto-dispositivos (ALSAADI; QUIRYNEN; KOMÁREK, 2008, DVORAK; ARNHART; HEUBERER, 2011, FABBRO et al., 2005, GHADA, et al., 2008, VASCONCELOS et al., 2016).

Uma teoria revolucionária trouxe a possibilidade da regeneração de tecido ósseo. A engenharia tecidual óssea funde os princípios e inovações interdisciplinares das áreas de Engenharia e das Ciências Biológicas, que tem por objetivo desenvolver substitutos para o tecido ósseo danificado (BALAZIC et al., 2007, DE WILD et al., 2013). Para restaurar, manter e melhorar a função do tecido ósseo, três elementos são os pilares fundamentais: o “Scaffold” ou estrutura veículo combinado com células e/ou, moléculas bioativas que induzem o crescimento de tecido ósseo - Fatores de crescimento (FC). Os “Scaffolds” ou estruturas veículo proporcionam suporte mecânico e proveem um substrato que estimula a adesão celular, proliferação e diferenciação. Os implanto-dispositivos de ligas metálicas como SUS316L aço inoxidável, ligas de Co-Cr-Mo, titânio e ligas, utilizados na cirurgia plástica e reconstrutiva, cirurgia ortopédica, cirurgia craniofacial e implantodontia oral podem ser considerados como “scaffolds” ou estrutura veículo para as aplicações de implanto contato-substituição óssea, como a substituição da articulação e dente, cura das fraturas e reconstrução das anormalidades esqueléticas congênitas (BALAZIC, et al., 2007, NIINOMI, 2008, X; P; C, 2004).

Na medicina e odontologia, o desenvolvimento de implanto-dispositivos baseados em ligas metálicas, principalmente titânio e ligas, elementos altamente utilizados, continuam sendo de interesse entre os pesquisadores da área medica-odontológica (GEETHA et al., 2009).

Os materiais considerados padrão-ouro dentro dos implanto-dispositivos para o reparo e substituição óssea na área da saúde, são as ligas de titânio, nióbio, zircônia, ligas de Ti-6Al-4V, e cerâmicas como hidroxiapatita (HA), óxido de alumínio ou β -fosfato tricálcico. Estes implanto-dispositivos a base de Titânio e ligas são considerados dispositivos que revolucionaram a saúde bucal e medicina reconstrutiva, devido as suas propriedades mecânicas, resistência a corrosão, e biocompatibilidade (FARIA et al., 2008, TOMAS; LARS; ANN, 2008). Evidências demonstram que a relação da adesão, proliferação, diferenciação ou apoptose sob uma superfície sólida, incluindo implantes de ligas metálicas, depende diretamente das propriedades físico-químicas da superfície, as que incluem elasticidade, morfologia e rugosidade, porosidade e molhabilidade (MASSARO et al., 2002, SJÖSTRÖM et al., 2013). Após a implantação, a superfície do implante está em contato com fluidos corporais e interagem com uma serie de proteínas e diferentes

tipos de células (ALLYSON et al., 2010). Assim também, a resposta de células especializadas em contato com a superfície do implante resulta no complexo sistema biológico que inclui absorção de proteínas, recepto-ligações e transdução de sinal, conhecida como osteointegração (ALLYSON, et al., 2010). Estas evidências relacionando as propriedades físico-químicas da superfície dos implanto-materiais e a resposta biológica do tecido ósseo permitem e conduzem as estratégias atualmente utilizadas no âmbito clínico. Melhoras nas superfícies tem promovido também observar taxas de sobrevida média de 94.4% para implantes dentários depois de acompanhamentos de 2 até 16 anos (DAVID; NADINE; RAY, 2006), assim como falhas globais de 1.9 % a 3.6% (ALSAADI; QUIRYNEN; KOMÁREK, 2008).

A existencia de falhas nos implantes resultam na necessidade do desenvolvimento da seguinte geração de implantes de ligas metálicas com revestimentos de superfícies biomiméticas, com o objetivo de imobilizar proteínas, fatores de crescimento, enzimas ou peptídios em biomateriais com a finalidade de induzir respostas de células e tecidos específicos ou para controlar a interface do tecido-implante através do envio de moléculas diretamente para a interface de forma controlando-se a exposição, a concentração, e a retenção e/ou liberação de tais biomoléculas (DAVID et al., 2010). Assim, com o desenvolvimento de revestimentos de superfícies biomiméticas, seria possível controlar a taxa de falhas associadas a doenças sistêmicas, perda óssea, doenças metabólicas crônicas ou danos devido a trauma degenerativo, má prática nas cirurgias de implantes, entre outros. Algumas técnicas recentes permitem a inclusão de agentes ativos na superfície do implante como óxidos metálicos por exemplo TiO_2 , ZrO_2 , e Al_2O_3 entre outros (JIN et al., 2012, RICHARDS et al., 2012, ANSELME, 2000). Poucos estudos têm usado biomoléculas como agentes modificadores da superfície dos implantes de titânio e ligas, sendo que os resultados obtidos são positivos (RICHARDS, et al., 2012, ANSELME, 2000, HONKALA, 2014, MCLAUGHLIN; BENNETT; TREVISI, 2001, VASCONCELOS et al., 2016).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Estabelecer a eficácia de revestimentos biomiméticos com superfície de interface sensível a estímulos (células-biomoléculas) para a resposta celular mediante a realização de uma revisão sistemática e testes laboratoriais in vitro.

1.1.2 Objetivos específicos

1.1.2.1 Avaliar e analisar sistematicamente a literatura disponível para determinar a resposta celular de superfícies de titânio tratadas pela técnica de polarização catódica.

1.1.2.2 Avaliar as técnicas integradas de sol-gel dip-coating e polarização eletroquímica na preparação de revestimentos de superfície biomiméticos em titânio

1.1.2.3 Avaliar a integridade das superfícies de Titânio após pré-tratamento mediante metalografia

1.1.2.4 Desenvolver biomoléculas ativas inovadoras na forma de sol.

1.1.2.5 Realizar, in vitro, a caracterização biomoléculas no revestimento e a avaliação de resposta biológica dos revestimentos biomiméticos em superfícies de titânio em contato com as células.

1.1.2.6 Comparar o crescimento celular nas superfícies de titânio entre os grupos experimentais com diferentes biomoléculas ativas.

1.1.2.7 Comparar a viabilidade celular entre as técnicas de modificação de superfícies usadas.

1.2 Hipótese

1.2.1 Superfícies de titânio tratadas mediante jateamento com nanopartículas e ataque ácido proporcionarão substratos apropriados para a ligação e fixação livre das biomoléculas sob o processo integrado de polarização eletroquímico e sol-gel dip-coating, mantendo a biocompatibilidade e bioatividade das biomoléculas na superfície do implante.

1.2.2 As técnicas de polarização eletroquímica e sol-gel dip-coating promoverão a deposição de biomoléculas e modificação das superfícies de titânio in vitro.

1.2.3 A presença das biomoléculas ativas nas superfícies tratadas promoverão maior crescimento celular in vitro

1.2.4 O tratamento de superfícies de titânio mediante a técnica eletroquímica de polarização catódica aumentará a viabilidade celular in vitro e promoverá crescimento ósseo.

2 Revisão de Literatura

2.1.1 Biomateriais, titânio e suas propriedades na osseointegração

O titânio é um elemento químico representado pelo símbolo Ti. O titânio apresenta número atômico 22 (representando 22 prótons e 22 elétrons), massa atômica igual a 47.90 u, densidade relativamente baixa (4,5 g/cm³), alto ponto de fusão (1668 °C) e módulo de elasticidade da ordem de 107 GPa (CALLISTER, 2007, NOORT, 2013). Possui duas formas cristalográficas, uma estrutura cristalina de fase alfa (α) e fase beta (β) a temperatura ambiente e acima da 883°C, respectivamente (CALLISTER, 2007).

O Titânio desempenha um papel importante na tecnologia moderna. É utilizado em formas diferentes, numa vasta gama de aplicações. Na forma de dióxido de titânio é usado em pigmentos brancos em alimentos, medicamentos, protetor solar, creme dental, papel, tintas ou plásticos. O titânio também é utilizado como elemento de ligas, promovendo maior resistência à tração, dureza, resistência à corrosão e capacidade de suportar temperaturas extremas. O titânio e suas ligas são essenciais na engenharia de alta tecnologia para a indústria aeroespacial, naval, energia e médicas (BOYER, 1995, SCHUTZ; WATKINS, 1998).

Nas aplicações médicas e odontológicas, os metais puros como titânio, tântalo, nióbio, zircônio, ligas cobalto-crômio, e cerâmicas (JUNG et al., 2001) são utilizados como biomateriais e são encontradas como parte de parafusos e pinos, implantes dentários e próteses craniofaciais (NIINOMI, 2008, PARR; GARDNER; TOTH, 1985, X; P; C, 2004). O desempenho destes biomateriais está relacionado com a biocompatibilidade - habilidade do material para obter respostas apropriadas no local da implantação - e com a biofuncionalidade - transferência de carga mecânica entre osso/implante e o desgaste - que são os principais requisitos exigidos dos biomateriais utilizados em implantes ósseos (BORN et al., 1998, LILJA et al., 2011, STEINEMANN, 1998) de forma que promove-se uma interação favorável com sistemas biológicos (NIINOMI, 2008, NOORT, 2013, ZINK, 2013).

Esta interação biológica favorável é devido às propriedades físico-químicas do material como a liberação controlada de íons, estabilidade dos compostos que são formados e os efeitos biológicos limitados destes íons (RAIKAR, 1995). Assim também

lhes é atribuída a formação de uma camada de óxido estável, com uma espessura de 3-10 nm, a qual forma-se espontaneamente quando o titânio é exposto ao oxigênio (KASEMO, 1983, SUL et al., 2002). Esta camada quimicamente inerte de dióxido de titânio é o principal responsável pelas propriedades biológicas do titânio em um organismo vivo (KAUS; PRÖBSTER; WEBER, 1996, ZINK, 2013), permitindo a osteointegração do implante-tecido ósseo, a conexão funcional e estrutural direta entre a superfície óssea e a superfície do implante sem o crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001, GOTO, 2014).

Por tanto, a taxa de biocompatibilidade e a qualidade da osteointegração (interação célula-material) dos implantes de titânio estão interligados diretamente com as suas propriedades físicas e mecânicas, assim como com a sua hidrofílicidade e propriedades química-topográficas da superfície (DE JONGE et al., 2008, GITTENS et al., 2014, GRASSI et al., 2006, LE GUÉHENNEC et al., 2007).

Os biomateriais utilizados na fabricação de tecnologias médicas podem ser classificados, segundo sua composição química, em metais, cerâmicos e polímeros. Segundo a sua atividade, podem ser classificados como biotolerante, bioinerte ou bioativos, que é a interligação da resposta biológica em relação aos tecidos (DONARUMA, 1988).

A resposta típica do tecido ósseo com relação a materiais bioinertes e biotolerantes é a encapsulação do implante por uma camada de tecido fibroso. Como resultado não formam uma ligação química com o organismo receptor (HENCH; WILSON, 1998). Em contraste, os materiais bioativos permitem a formação de um novo osso e a troca de íons com o tecido, conduzindo as ligações químicas na interface osso-implante, sem que ocorra o encapsulamento fibroso (HENCH; ETHRIDGE, 1982, HENCH; WILSON, 1998).

No entanto, o titânio e as ligas de titânio têm algumas deficiências associadas à relação da biocompatibilidade e a osteogenesis, que ainda são matéria de debate (MAURER; MERRITT; BROWN, 1994). A incapacidade da liga de titânio para a total osteointegração pode ser atribuída à liberação de íons de vanádio e alumínio (YORUC et al., 2007, YOSHIMITSU; EMIKO, 2005), o que leva a uma pobre osteointegração e falha do implante (RAJWANT et al., 2009). O titânio não melhora ou aumenta a osteogênese e carece de osteocondutividade (RAHAL; BRANEMARK; OSMOND,

1993). Outra limitação são os aspectos estéticos relacionados à cor (HEYDECKE; KOHAL; GLÄSER, 1999).

2.1.2 Fisiologia óssea, células ósseas e células tronco dentárias

O tecido ósseo é uma estrutura mineralizada complexa formada por uma fase mineral incorporada numa matriz orgânica (CLARKE, 2008; MARTIN, 2006). O osso é um nano-compósito com propriedades únicas, determinada pela composição físico-química (LINß; FANGHÄNEL, 1998; WEINER; TRAUB, 1992). A matriz óssea é composta por substâncias inorgânicas e orgânicas (LINß; FANGHÄNEL, 1998), podendo ser descrito como um composto biocerâmica (OLSZTA et al., 2007). A matéria seca no tecido ósseo está composta por 70% de fase inorgânica ou mineral e por 30% de matriz ou fase orgânica (CLARKE, 2008; WINFIELD; MIMURA, 1992). A fase inorgânica do osso está composta por hidroxiapatita e apatita CaP (EASTOE, 1968; TZAPHLIDOU, 2008). A Hidroxiapatita óssea é pouco cristalina e apresenta uma rede complexa, devido à heterogeneidade do seu sistema estrutural. A relação Ca / P do mineral do osso pode variar de 1,50 a 1,90 dependendo da idade e da localização do ósseo. Esta relação Ca / P é afetada durante o envelhecimento ou por doenças ósseas, sugerindo que as quantidades de espécies de carbonato podem mudar de acordo com o estado do osso (STAUBER; MÜLLER, 2005). Apatitas biológicas são apatitas carbonatadas, e contêm diversos íons, incorporados na estrutura de cristais da apatita. Por tanto, as fases minerais do osso, esmalte e dentina apresentam ligeira diferença na composição iônica (RACQUEL ZAPANTA, 2008). A fase orgânica do tecido ósseo compreende uma matriz de fibras de proteína. Estas fibras estão dispostas em camadas e contêm cristais minerais (BURR, 2002).

Existem três tipos distintos de células ósseas: osteoblastos, osteoclastos e osteócito. Os osteócitos são considerados osteoblastos totalmente diferenciadas. Osteoblastos têm mostrado ser uma forma mais avançada de fibroblastos (DUCY et al., 2000). Os osteoblastos são responsáveis pela formação da matriz de colágeno, de regular a diferenciação dos osteoclastos e tem um importante papel no processo de mineralização (CURREY, 2002). Fibroblastos, osteoblastos, osteócitos e adipócitos, são originados a partir das células-tronco mesenquimais pluripotentes (CHRISTINE; TATIANA, 2012).

As células tronco são definidas como um grupo especial de células clonogênicas que são caracterizadas pela capacidade de auto renovação e diferenciação multilinhagem. Estas células são responsáveis pela renovação dos tecidos, e para a cura e regeneração após lesões (SU-MIN; QUNZHOU; ANH, 2014; VAN DER KOOY; WEISS, 2000). As células-tronco podem ser divididas principalmente em três tipos: células-tronco embrionárias (ESCs), células-tronco pós-natal ou adultas (ASCs), e as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). ESCs são encontrados na massa celular interior de blastocistos de mamíferos durante as fases iniciais do desenvolvimento do embrião e tem expansão ilimitada e pluripotência para diferenciar-se em todos os tipos de células somáticas (THOMSON et al., 1998).

2.1.3. Biomoléculas

O termino biomolécula é muito amplo, pois pode ser adaptado segundo o contexto de estudo. Uma biomolécula, no caso da engenharia tecidual, refere-se a todo material biológico, tais como as proteínas ou de oligonucleotídeos, excluindo as células e as proteínas estruturais celulares, passíveis de serem incluídos nas células.

Essa definição inclui agentes biológicos com grande diversidade de funções "chaves" tanto para a montagem da integridade estrutural de *constructs* de tecidos quanto para os parâmetros funcionais desse *construct*.

Desde uma perspectiva de uso na engenharia tecidual, a população de biomoléculas pode ser classificada em fatores de crescimento, fatores de diferenciação, fatores angiogênicos e proteínas morfogênicas ósseas (MCINTIRE; CENTER, 2003). Segundo o seu peso molecular (5 kDa), as biomoléculas podem ser classificadas em dois grupos: (a) moléculas grandes, que incluem fatores de crescimento, citocinas e as suas correspondentes codificações de ácidos nucleicos; e (b) moléculas pequenas que incluem drogas, peptídeos e oligonucleotídeos (PETER; SPYRIDON; GEORGE, 2007).

As biomoléculas desempenham um papel importante para aplicações terapêuticas na regeneração do osso e constituem uma terapia promissora para a reconstrução, que induzem a regeneração óssea no local de defeito (BARRÈRE et al., 2008). Os processos de regeneração óssea na região crâniomaxilofacial são iniciados

em resposta a uma lesão, seguida do desenvolvimento do osso, coordenado por células derivadas de periósteo, osso e tecidos externos ao redor do local do defeito (BARRÈRE, et al., 2008, ELEFTHERIOS; NEIL; PETER, 2007).

Nesta mesma perspectiva, na última década, surgiram novas estratégias para promover a imunomodulação, regeneração osseas e a cura com base nas propriedades únicas dos óxidos metálicos - íons metálicos, tais como TiO_2 , ZrO_2 e Al_2O_3 , MnO_2 , ZnO , Fe_3O_4 , e WO_3 entre outros (VASCONCELOS et al., 2016). O conhecimento sobre reações toxicológicas e imunológicas das partículas e íons metálicos avançou consideravelmente, de fato, as células são capazes de interagir com íons metálicos em concentrações não tóxicas no microambiente de tecido, mas também a nível sistêmico (VASCONCELOS et al., 2016, SKORB; ANDREEVA, 2013). As células são sensíveis aos íons e seus mecanismos e comportamento podem, pelo menos em parte, ser modulados por essas espécies inorgânicas. Estes agentes são baratos, estáveis e podem ser integrados em biomateriais, o que pode abrir novos caminhos para uma nova geração de dispositivos médicos (VASCONCELOS et al., 2016, SKORB; ANDREEVA, 2013, KENRY; LIM, 2017).

2.1.4. Técnicas de tratamento de superfície de implantes de titânio

Vários tratamentos físicos e químicos para o Titânio foram propostos na literatura com a finalidade da obtenção de superfícies físico-químicas com melhor biocompatibilidade (X; P; C, 2004). Estas técnicas incluem a imersão e soluções ácidas, jateamentos, revestimento com fosfatos de cálcio, filmes obtidos por técnicas sol-gel, tratamentos alcalinos com condensação térmica, tratamentos térmicos, eletroquímicos, deposições química e física por vapor, deposições por feixe iônico e implantação de íons, cobertura com plasma spray, deposição de fosfato de cálcio e hidroxiapatita (OSHIDA, 2006, PULEO; NANJI, 1999).

Estes métodos para alterar a energia, a carga e a composição da superfície no titânio resultam em superfícies com rugosidade e morfologia modificada. A energia da superfície desempenha um papel importante, não só na adsorção de proteínas, mas

também na adesão e proliferação das células (AUBLIN, 1999, BAIER; MEYER, 1988, SYKARAS et al., 2000). A carga da superfície também influencia na orientação molecular e celular e as atividades metabólicas das células (SCHWARTZ et al., 2003). A rugosidade da superfície do implante desempenha um papel significativo no processo de fixação das células e a união entre elas e o tecido circundante, levando a uma cicatrização mais eficiente. Estes métodos - jateamentos, soluções ácidas e plasma spray - no titânio são típicos para o desenvolvimento de superfícies rugosas e tem sido documentadas em trabalhos "*In Vitro*" e "*In Vivo*" (BOYAN et al., 1998, BUSER et al., 1991).

Para aumentar a rugosidade da superfície sólida, uma série de técnicas baseadas em laser tem sido usadas na última década (BÄUERLE, 2000). A inclusão de alguns elementos como nitrogênio no Ti tem permitido minimizar o desgaste significativamente (WINFIELD; MIMURA, 1992). Para melhorar a qualidade das propriedades mecânicas e correção do implante, estudos têm usado alguns métodos para incluir íons na estrutura (BUCHANAN; LEE; WILLIAMS, 1990).

Materiais, como o revestimento com reativos de fosfato de cálcio (CaP) ou hidroxiapatita (HA), têm sido utilizados devido a semelhança química com os minerais do osso (LIMIN et al., 2001). Vários estudos têm mostrado que os revestimentos de CaP e HA alcançaram uma resposta aceitável ao contato íntimo entre o implante e o osso (LIMIN, et al., 2001, ROHANIZADEH et al., 2005). Outros estudos de revestimentos de HA em implantes mostraram sinais de descamação do material de revestimento da superfície do implante, o qual pode induzir reações negativas para o corpo (MATSUI et al., 1994).

O desenvolvimento de futuras técnicas de revestimento de superfície serão influenciadas por tecnologias e inovações emergentes que incluirão terapias biomoleculares, fatores como BMP-2, TGF- β 1, para controlar as funções biológicas específicas concomitantes a agentes de controle de infecção (HAYES; RICHARDS, 2010, HAYES; RICHARDS, 2010, PEARCE et al., 2008).

2.1.5. Técnicas de caracterização

2.1.5.1. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica muito versátil e utilizada rotineiramente para a análise microestrutural e morfológica de superfícies de materiais, onde o feixe de elétrons induz a uma maior profundidade do foco que um feixe de luz regular resultando em imagens de altíssima resolução que podem ser gravadas.

A coluna, mantida sob vácuo inferior a 10^{-4} Torr, contém em sua porção superior um canhão de elétrons e, abaixo deste, lentes magnéticas para a focalização de um fino feixe de elétrons sobre a amostra. A quantidade de corrente no feixe de elétrons incidente sobre a amostra determina a intensidade dos sinais a serem emitidos, a qual, por sua vez, $\propto$ diretamente proporcional ao diâmetro do feixe, implicando no ajuste dos controles do microscópio para a otimização da condição de operação desejada: alta resolução (ϕ feixe de 3 a 10 nm), elevada profundidade de foco ou microanálise (ϕ feixe de 0,2 a $1\mu\text{m}$). A fonte mais usual de elétrons corresponde à emissão termiônica gerada a partir de um filamento de tungstênio aquecido a 2700°K (GOLDSTEIN, 2003).

A câmara de amostras conta com diferentes tipos de detectores para captar os sinais gerados na interação elétrons-amostra e um suporte, motorizado ou não, que possibilita a movimentação das amostras em três eixos (x, y e z), além de rotação e inclinação lateral. Duas concepções construtivas são adotadas referentes às condições de vácuo: alto vácuo equivalente àquele existente na coluna, e de baixo vácuo (10^{-2} Torr) esta última necessitando o emprego de um detector especial para a coleta de imagens de topografia (PONZ; LADAGA; BONETTO, 2006). A versatilidade do microscópio eletrônico de varredura, deve-se à diversidade de interações que ocorrem quando o feixe de elétrons atinge a amostra. Estas interações, avaliadas por diferentes detectores, fornecem informações sobre a composição, topografia, cristalografia, potencial elétrico e campos magnéticos locais, dentre outras (GOLDSTEIN, 2003).

2.1.5.2. Microanálise de raios-X por espectroscopia de energia dispersiva

A microanálise é um dos mais importantes instrumentos para a análise química de materiais orgânicos e inorgânicos. Através da identificação dos raios-X emitidos

pela amostra, quando há interação com o feixe eletrônico, é possível determinar a composição de regiões com até 1 μm de diâmetro. É uma técnica não destrutiva, permitindo determinar quantidades de até 1-2% dos elementos presentes na amostra (GOLDSTEIN, 2003).

2.1.5.3. Difração de Raios-X

A difratometria de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento, particularmente na engenharia e ciências de materiais, engenharias metalúrgica, química e de minas, geociências, dentre outros.

Os raios X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo (dispersão ou espalhamento coerente). O fóton de raios X após a colisão com o elétron muda sua trajetória, mantendo, porém, a mesma fase e energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física ondulatória, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida, onde cada elétron vai atuar.

Se os átomos que geram este espalhamento estiverem arranados de maneira sistemática, como em uma estrutura cristalina, apresentando entre eles distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que efeitos de difração dos raios X podem ser observados em vários ângulos.

3 Projeto de Pesquisa

3.1 Introdução/Justificativa

O tecido ósseo é um tecido de estrutura mineralizada complexa e de propriedades únicas na sua composição físico-química, que está estreitamente ligada a uma matriz orgânica (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006, JOHN, 2005, MARY, 2003). Este tecido possui um complexo mecanismo de defesa que tem a capacidade de regeneração em caso de trauma e perda parcial do tecido (AI-AQL et al., 2008). Evidências demonstram que a mineralização óssea é um processo regulado por células especializadas, desencadeado pela secreção de moléculas bioativas específicas (PHAN; XU; ZHENG, 2004). Estas células ósseas especializadas (osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células de revestimento ósseo) estão fortemente reguladas e coordenadas para vários eventos de reabsorção e formação, que ocorrem para a formação, preservação e adaptação da estrutura e propriedades do tecido ósseo (MARKS; POPOFF, 1988, RAGGATT; PARTRIDGE, 2010), assim também na osteointegração (GOTO, 2014, RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). Quando o tecido ósseo é submetido a uma injúria - como trauma, implanto-cirurgia, perda óssea ou eventos que proporcionam a destruição do tecido óssea (VINCENT et al., 2004) ocorre um processo de sinalização para as células progenitoras presentes no tecido ósseo, de forma que estas migram para o sítio da injúria. Neste processo de migração, as células iniciam a diferenciação em células ósseas especializadas sob a secreção de moléculas bioativas (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006, MILLER; JEE, 1987).

A diferenciação celular é fundamental para que o reparo do tecido ósseo ocorra. Esta diferenciação é conduzida por moléculas bioativas (TGF β e BMP) que induzem a células indiferenciadas se tornarem estruturas altamente especializadas, com capacidade de secretar matriz extracelular óssea (MEC), e recentemente pesquisas com tem reportada que o uso de óxidos metálicos têm colaborado com esse processo (GENTILI; CANCEDDA, 2009, SKORB; ANDREEVA, 2013, NOURI; WEN, 2015). Em casos extremos, como perda óssea, doenças metabólicas crônicas, danos devido a trauma degenerativo, esta capacidade de regeneração osteogênica pode não ocorrer devido a anomalias na fisiologia óssea (YAIR et al., 2008). Estas anomalias estão relacionadas a mudanças na quantidade e qualidade óssea, o que significa um desafio

nos tratamentos com implantes na medicina nas diversas áreas como implantes orais, cirurgia plástica e reconstrutiva, cirurgia ortopédica, cirurgia craniofacial (BALAZIC, et al., 2007, JEFFCOAT, 2005). Soma-se a estes desafios, as diversas problemáticas biomecânicas e biológicas da tecnologia atual em implantologia. Estes fatores em conjunção com a necessidade de reabilitação óssea de um indivíduo podem interferir na qualidade de vida dos indivíduos (PETERSEN, 2003, QUIRYNEN et al., 2006).

A possibilidade de desenvolver materiais com revestimentos de superfície biomiméticos que desencadeiem uma interface sensível e induzam multiestímulos e respostas para a rápida osteointegração, tratamento terapêutico de doenças sistêmicas, tratamento e prevenção de infecções, resposta ao pH e temperatura são alvos de estudo de centros de pesquisa no mundo (BALAZIC, et al., 2007, GLADIUS, 2013). Materiais utilizados com este intuito poderiam também ser empregados em áreas diversas, onde os tecidos encontram-se cercados por tecido mineralizado (ósseo). Resultados promissores obtidos previamente indicam grande potencial no desenvolvimento de materiais inovadores e na aplicação biológica destes de forma eficaz e eficiente.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivos geral

Desenvolver e investigar a eficácia de revestimentos biomiméticos com superfície de interface sensíveis a estímulos (células-biomoléculas) para a rápida osteointegração, e comparar o potencial dos revestimentos de superfícies biomiméticas ao dos revestimentos de superfícies não-biomiméticas no tecido ósseo.

3.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as técnicas integradas de sol-gel dip-coating e polarização eletroquímica na preparação de revestimentos de superfície biomiméticos em titânio, e avaliar a integridade das biomoléculas no revestimento após deposição.

- Realizar, in vitro, a avaliação de resposta das biomoléculas, a biodisponibilidade e a resposta biológica dos revestimentos biomiméticos em superfícies de titânio, em contato com as células osteoblasticas e células-tronco.
- Avaliar a morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Avaliar a capacidade de adesão, diferenciação e proliferação nos revestimentos biomiméticos das células tronco e osteoblastos, in vitro.
- Avaliar e pesquisar o comportamento de células-tronco e osteoblastos quando estão associadas com revestimentos de superfícies biomiméticos nanoestruturados.
- Elucidar a influência, do revestimento de superfície biomimética nas células, sobre a capacidade de adesão, proliferação, diferenciação ou apoptose dessas nanoestruturas.

3.3. Hipótese

A hipótese a ser testada será de que a superfície de titânio tratada com jateamento com nanopartículas e ataque ácido poderia proporcionar um substrato apropriado para a ligação e fixação livre das biomoléculas sob o processo integrado de polarização eletroquímico e sol-gel dip-coating, mantendo a biocompatibilidade e bioatividade das biomoléculas na superfície do implante.

3.4. Material e Métodos

3.4.1. Preparação das amostras e caracterizações

Discos de titânio comercialmente puro (ASTM grau IV) da empresa Conexão Sistema de Próteses (SP, Brasil) serão utilizados para esta pesquisa. Os espécimes

serão tratados em 3 fases e receberão 2 tipos de técnicas integradas sol-gel dip-coating e polarização eletroquímica, descritos na figura 1.

Na etapa 1, a divisão de grupos está descrita na figura 2. O grupo controle será a superfície de titânio. Os grupos experimentais receberão polarização eletroquímica em diversas configurações. Na etapa 2, baseadas nos resultados das configurações obtidas para a modificação físico-química da etapa 1, serão aplicadas estas configurações nas técnicas integradas sol-gel dip-coating e polarização eletroquímica. A divisão de grupos desta etapa pode ser observada na figura 2. Na etapa 3, o produto final, com as configurações obtidas na fase 1 e 2, será realizada a polarização eletroquímica biomimética. A divisão dos grupos está descrita na figura 2.

3.4.1.1. Método sol-gel dip-coating

A deposição de camadas será realizada mediante o processo de *sol-gel dip coating*. O processo sol-gel permite o preparo de biomateriais se controlando a taxa das reações de hidrólise e condensação de alcóxidos, durante a transição sol-gel (GUPTA; KUMAR, 2008, HADDOW et al., 1996). Esse processo permite a obtenção de materiais inorgânicos ou híbridos orgânico-inorgânicos na qual ocorrem reações de hidrólise e condensação do precursor para a formação de partículas de tamanho coloidal (sol) na sequência da rede tridimensional (gel) (BALAMURUGAN et al., 2006, GUPTA; CHAUDHURY, 2007).

O processo de sol-gel aplicado na tecnologia moderna é considerado como um método de síntese econômico, sustentável, de baixo custo, com a capacidade de preparar revestimentos de alta qualidade e com a possibilidade de serem aplicados em áreas de superfícies mais extensas, otimizando o resultado e promovendo, alta homogeneidade, com um controle preciso da composição, da morfologia em nano-escala, da porosidade, da espessura e de parâmetros que influenciam na cinética do filme, além de durabilidade e eficiência de coloração do caso de dispositivos eletrocromáticos. Permite, ainda, a geração revestimentos com ótimas propriedades físicas-químicas e bioativas adaptadas (H. PODBIELSKA, 2005, XIHUA et al., 2005).

3.4.1.2. Método Eletroquímico

O processo de polarização eletroquímica tem atraído atenção devido às propriedades geradas como resultado das modificações de superfície no biomaterial tratado (BRUNETTE, 2001, YOUNG-TAEG et al., 2002).

No processo de polarização eletroquímica o substrato metálico será imerso em um eletrólito sob a aplicação de um potencial de baixa voltagem. Dessa forma, serão obtidas películas de óxidos com características e propriedades controladas por parâmetros eletroquímicos como potencial (E), corrente (i), velocidade de varredura (v), entre outros. Este tipo de modificação superficial promoverá melhor resistência à corrosão e um aumento da bioatividade do material (CHIH-YAO et al., 2009, YAO; SLAMOVICH; WEBSTER, 2008).

3.4.1.3. Caracterização química e microestrutural das amostras

A Espectrometria de massas de íons secundários (SIMS) permitirá analisar elementos presentes nas superfícies em baixas concentrações ou para obter razões isotópicas de uma pequena parte das amostras. A morfologia e topografia da superfície serão analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por difração de Raios-X(DRX). A dureza e o módulo de elasticidade serão medidas com o durômetro para ensaio de dureza Vickers com aumento de até 500x (Figura 1).

A eficiência de bioatividade será analisada pelas técnicas de MEV, Espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS), DRX e Infravermelho (IV), após os ensaios *in vitro* com células osteoblasticas e células tronco nas superfícies biomiméticas (Figura 1).

3.4.2. Avaliação da biocompatibilidade “In Vitro”

As avaliações de biocompatibilidade dos materiais serão em “*in vitro*” utilizando cultura de células e modelos biológicos (DAVIES, 2003). A análise na biocompatibilidade “*in vitro*” engloba geralmente cultura de células com objetivo da avaliação dos aspectos morfológico, capacidade de crescimento, estado de

diferenciação, viabilidade e adesão dos osteoblastos em contato com diferentes superfícies de titânio(ANSELME et al., 2000). Diferentes modelos de cultura de osteoblastos são utilizados para avaliar a interação célula-superfície, que comumente utilizam culturas primárias derivadas de osteoblastos humanos normais (explantes ósseos, células da medula óssea) e fragmentos ósseos, ou linhagens de osteoblastos e células tronco provenientes de osteosarcoma humano(LIU et al., 2007, SUBRAMANIAM et al., 2002).

As caracterizações *in vitro* serão através de cultura de células utilizada para determinar a expressão de marcadores fenotípicos de osteoblastos que mineralizarem sua matriz extracelular (BERNHARD et al., 2009). A viabilidade celular será determinada por meio de ensaios de citotoxicidade, adesão e proliferação celular, avaliação da morfologia celular por MEV. Para determinar a expressão genética será utilizada a reação em cadeia da polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR) e eletroforeses, nas camadas de células aderidas sobre a superfície de titânio (Figura 1).

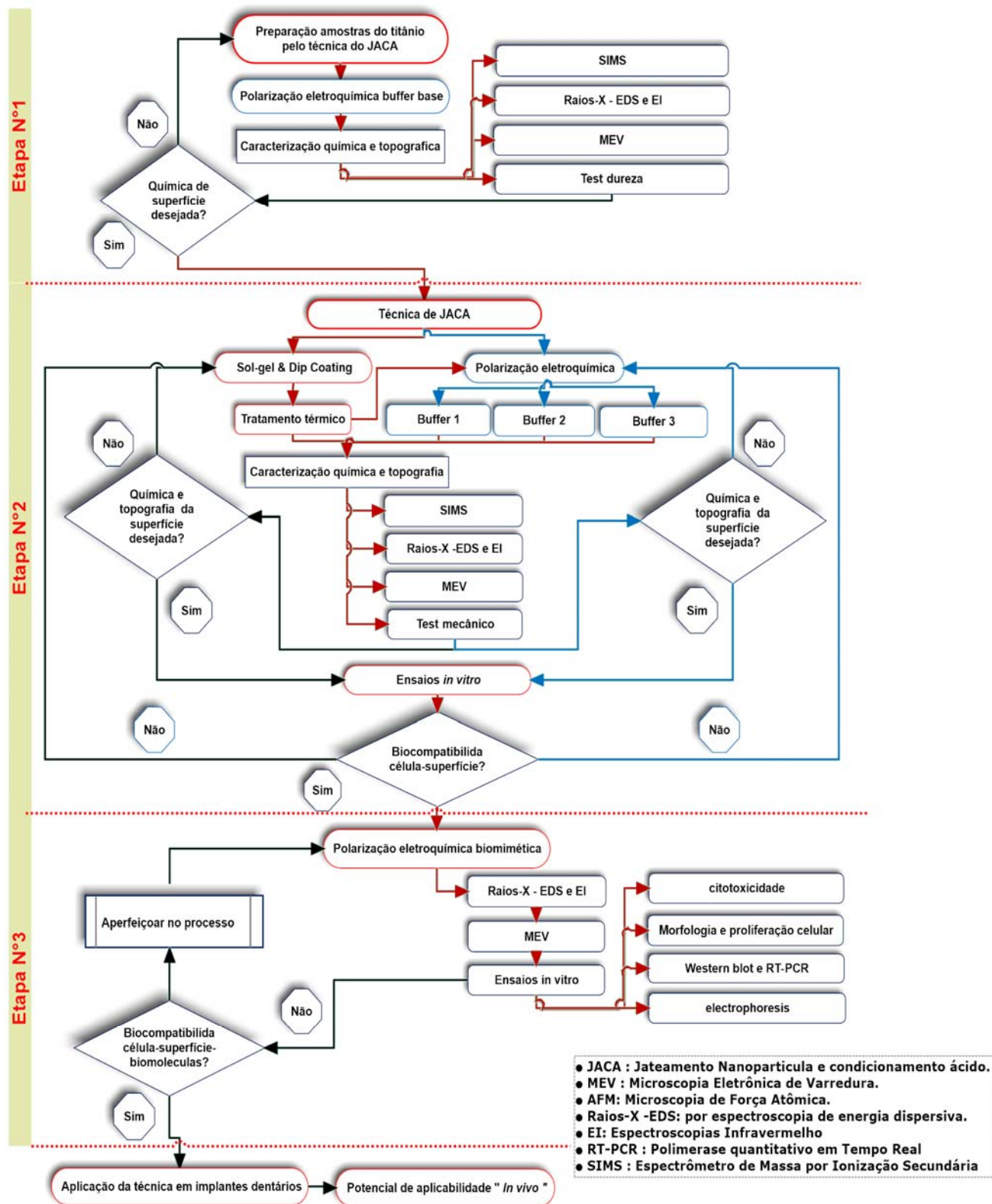


Figura1 - Fluxograma da preparação e caracterizações de superfícies biomiméticos-titânio

Fonte: O autor

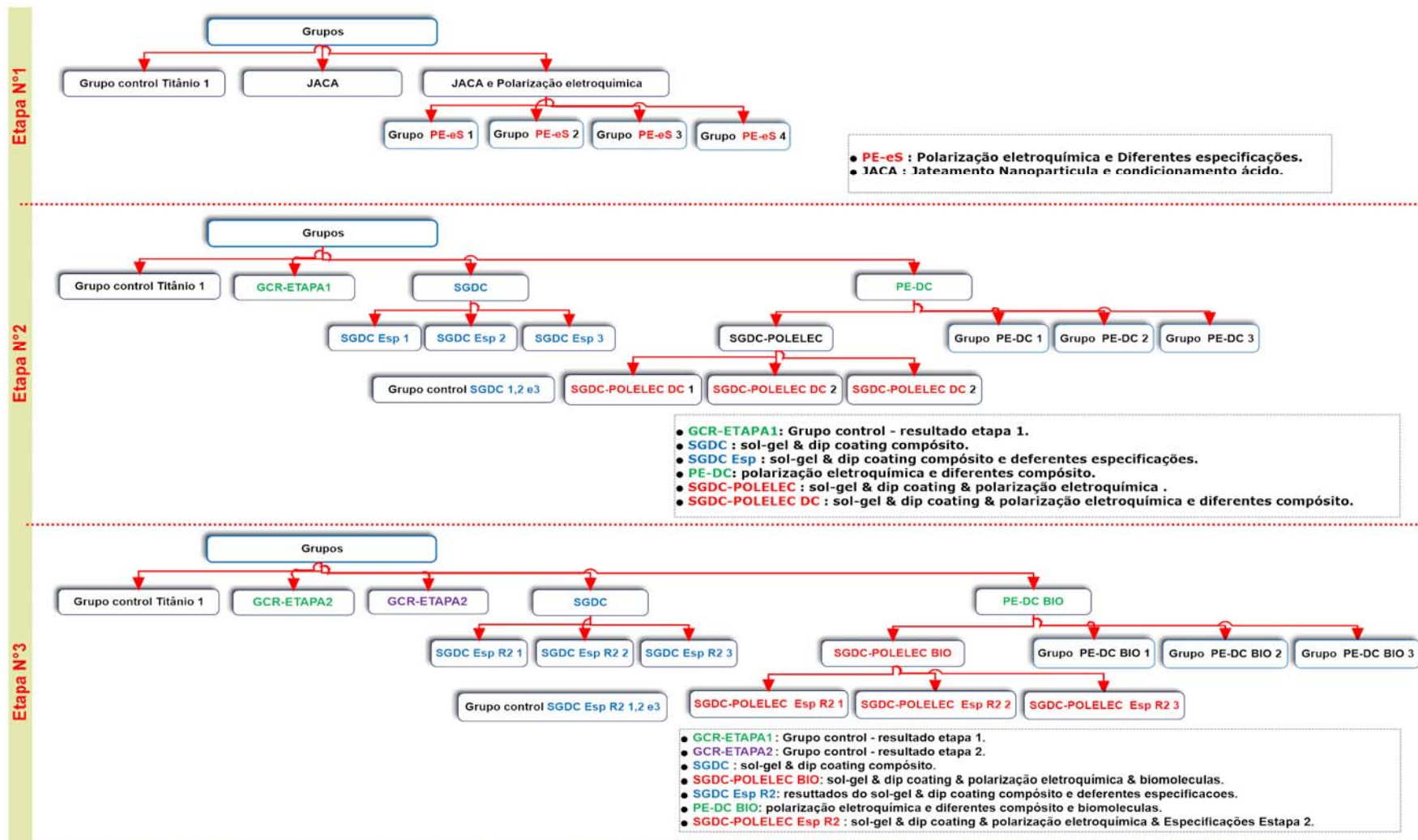


Figura 2 - Grupos experimentais das etapas do estudo

Fonte: O autor

3.5. Orçamento

Quadro 2 – Orçamento de materiais e reagentes

Orçamento Materiais e Reagentes		
Material	Quantidade	Valor total R\$
Reagentes e insumos químicos e outros		
Reagentes	total de reagentes	58025
Luvas	12 caixas	100
Óculos de segurança	1 unidade	10
Fitas de teflon	1 unidade	50
Roupa de proteção	1 unidade	120
Cartuchos para impressora	5 kids	150
Folhas A4	5 unidade	240
Total		58695

3.7. Descrição em detalhe do orçamento dos reagentes do trabalho laboratorial

Quadro 3 – Orçamento detalhado de reagentes do trabalho laboratorial

Material	Valor Aprox. (R\$)	Quantidade
Capital – Material Permanente		
Célula eletroquímica. Volume de 400 mL. METROHM	29,372.85	1
Vidraría e frascos parte experimental	-	-
Sub -Total Capital: R\$		
Custeio – Material de Consumo		
Reagentes viabilidade Celular		
Soro Fetal US Definido Hyclone (500 ml)	1.900,00	2
Frascos e garrafas de Cultivo Celular (25 e 75 cm ³)	-	-
Células endoteliais adultas da microvasculatura dérmica humana	2.640,00	1
Preparo os revestimentos nas superfícies biomiméticas		
Reagente Sigma-Aldrich, utilizados como modificador químico e nanoestruturadas da superfície para o desenvolvimento do revestimento biomiméticos		
Discos de titânio Kg	19.39	2
Discos de TiZr Kg	25.5	2
Partículas de óxido de silício	1480	1
Partículas de óxido de alumínio	556	1
Ácido clorídrico HCl	643	2
Ácido sulfúrico H2SO4	481	2
Ácido acético C2H4O2	452	3
Acetato de sódio C2H3NaO2	276	3

Reagente Sigma- utilizados como modificador químico e nanoestruturadas da superfície para desenvolver um ambiente 3D utilizado para deposição do revestimento biomimético pelas técnicas sol-gel dip-coating e polarização eletroquímica catódica		
Hidroxiapatita base metálica	481	1
Nitrato de cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	208	1
Nitrato de estrôncio $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$	491	1
Pentóxido de fósforo P_2O_5	118	1
Cloreto de estrôncio	499	1
Acetato de estrôncio – $\text{Sr}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	735	1
Cloreto de sódio - NaCl	124	1
Fluoreto de sódio - NaF	280	1
Solução de ácido clorídrico – HFp	566	1
Ácido acético	452	3
Acetato de sódio	276	3
Hidreto de lítio LiH	323	1
Cloreto de lítio LiCl	458	1
Acetato de lítio CH_3COOLi	654	1
perclorato de lítio LiClO_4	877	1
Solução de fosfato tamponada	493	3
pamidronate	590	1
Zoledronate	750	1
ibandronate	882	1
enamel matrix derivative powder EMD	5516	1
Tobramycin $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_9$	442	1
Doxy Hyclate - Doxycycline $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 462.45	211	2
TGF	2,516	1

3.8. Grupos experimentais

Quadro 4 – Definição de grupos experimentais

O processo de eletro-revestimento pelo processo de polarização catódica			
Tampão (buffer) composição	Formulação	pH	Especificações do processo
[Ácido acético]– [Acetato de sódio]	[C ₂ H ₄ O ₂] – [C ₂ H ₃ NaO ₂]	3	Temperatura 20 - 21 °C Polarização catódica galvânica 0.7 mA/cm2 & 1 hora 1.6 mA/cm2 & 6 horas 3.9 mA/cm2 & 6 horas
[Ácido acético]– [Acetato de sódio] - [enamel matrix derivative powder]	[C ₂ H ₄ O ₂] – [C ₂ H ₃ NaO ₂] - [EMD]	3	
[Ácido acético]– [Acetato de estrôncio]	[C ₂ H ₄ O ₂] – [Sr(C ₂ H ₃ O ₂) ₂]	5	
[Ácido acético]– [Acetato de estrôncio] -[Cloreto de sodio]	[C ₂ H ₄ O ₂] – [Sr(C ₂ H ₃ O ₂) ₂] – [NaCl]	5	
[Ácido acético]– [Acetato de estrôncio] -[Fluoreto de sódio]	[C ₂ H ₄ O ₂] – [Sr(C ₂ H ₃ O ₂) ₂] – [NaF]	5	
[Ácido acético]– [Acetato de sódio] -[Cloreto de sodio] -[Doxycycline]	[C ₂ H ₄ O ₂] – [Sr(C ₂ H ₃ O ₂) ₂] – [NaCl] – [C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ •H ₂ O 462.45]	3	
O processo Sol-gel & Dip-coating			
Dióxido de zircônio	[ZrO ₂]		
Dióxido de titânio	[TiO ₂]		
Dióxido de titânio: Lítio: zircônio	[TiO ₂]:[Li ⁺ 15%]:[Zr 15%]		
Dióxido de titânio: Lítio	[TiO ₂]:[Li ⁺ 15%]		
Indium tin oxide	ITO		
Dióxido de titânio : Lítio: Estrôncio	[TiO ₂]:[Li+ 15%]:[Sr 15%]		

Referências do Projeto

AI-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **Journal of dental research**, 2008.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, 2001.

ALGHAMDI, H. S.; JANSEN, J. A. Bone regeneration associated with nontherapeutic and therapeutic surface coatings for dental implants in osteoporosis. **Tissue Eng Part B Rev**, v.19, n.3, p.233-253, 2013.

ALLYSON, I.; STEVEN, M. K.; WILLIAM, K.; PRIYANKA, S.; RYAN, S.; ANDRE VAN, O.; RAJESH, B.; RAYMOND, R.; TODD, L.; KARIN, B.-J.; JORGE, I. In Vivo Deformation, Surface Damage, and Biostability of Retrieved Dynesys Systems. **Spine**, 2010.

ALSAADI, G.; QUIRYNEN, M.; KOMÁREK, A. Impact of local and systemic factors on the incidence of late oral implant loss. **Clinical oral implants**, 2008.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials *Biomaterials*, v.21, n.7, p.667-681, 2000.

ANSELME, K.; BIGERELLE, M.; NOEL, B.; DUFRESNE, E.; JUDAS, D.; IOST, A.; HARDOUIN, P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. **Journal of biomedical materials research**, v.49, n.2, p.155-166, 2000.

AUBLIN, J. E. Bone stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.72, n.30-31, p.73-82, 1999.

AWS, A.; RUPERT, A.; SERPIL, D. Contemporary management of tooth replacement in the traumatized dentition. **Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology**, 2012.

BAIER, R. E.; MEYER, A. E. Implant surface preparation. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.3, n.1, 1988.

BALAMURUGAN, A.; BALOSSIER, G.; KANNAN, S.; RAJESWARI, S. Elaboration of sol-gel derived apatite films on surgical grade stainless steel for biomedical applications. **Materials Letters**, 2006.

BALAZIC, M.; KOPAC, J.; JACKSON, M. J.; AHMED, W. Review: titanium and titanium alloy applications in medicine. **International Journal of Nano and Biomaterials**, v.1, n.1, p.3-34, 2007.

BAN, S.; MARUNO, S.; ARIMOTO, N.; HARADA, A.; HASEGAWA, J. Effect of electrochemically deposited apatite coating on bonding of bone to the HA-G-Ti composite and titanium. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.36, n.1, p.9-15, 1997.

BARRÈRE, F.; MAHMOOD, T. A.; DE GROOT, K.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v.59, n.1-6, p.38-71, 2008.

BÄUERLE, D. **Laser Processing and Chemistry**. Springer, 2000.

BECKER, S. T.; BECK-BROICHSITTER, B. E.; ROSSMANN, C. M.; BEHRENS, E.; JOCHENS, A.; WILTFANG, J. Long-term Survival of Straumann Dental Implants with TPS Surfaces: A Retrospective Study with a Follow-up of 12 to 23 Years. **Clin Implant Dent Relat Res**, 2015.

BEPPU, K.; KIDO, H.; WATAZU, A.; TERAOKA..., K. Peri-Implant Bone Density in Senile Osteoporosis-Changes from Implant Placement to Osseointegration. **implant dentistry and ...**, 2011.

BERNHARD, S.; MARIA, B.; MARC, C. M.; RALF, J. K. The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. **Biomaterials**, 2009.

BORN, R.; SCHARNWEBER, D.; RÖßLER, S.; STÖLZEL, M.; THIEME, M.; WOLF, C.; WORCH, H. Surface analysis of titanium based biomaterials. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.361, n.6-7, p.697-700, 1998.

BOYAN, B. D.; BATZER, R.; KIESWETTER, K.; LIU, Y.; COCHRAN, D. L.; SZMUCKLER-MONCLER, S.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$. **J Biomed Mater Res**, v.39, n.1, p.77-85, 1998.

BOYER, R. R. Titanium for aerospace: Rationale and applications. **Advanced Performance Materials**, v.2, 1995.

BRUNETTE, D. M. **Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications**. Springer, 2001.

BUCHANAN, R. A.; LEE, I. S.; WILLIAMS, J. M. Surface modification of biomaterials through noble metal ion implantation. **J Biomed Mater Res**, v.24, n.3, p.309-318, 1990.

BUSER, D.; SCHENK, R. K.; STEINEMANN, 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.

CALLISTER, W. D. **Materials Science And Engineering: An Introduction**. John Wiley & Sons, 2007.

CHEN, G. F.; WEN, X. J.; ZHANG, N. Corrosion resistance and ion dissolution of titanium with different surface microroughness **Bio-Medical Materials and Engineering**, v.8, n.2, p.61-74, 1998.

CHENG, H.-C.; LEE, S.-Y.; CHEN, C.-C.; SHYNG, Y.-C.; OU, K.-L. Titanium nanostructural surface processing for improved biocompatibility **Applied Physics Letters**, v.89, n.17, 2006.

CHIH-YAO, C.; SHIH-HWA, C.; WEI-EN, Y.; MING-LUN, H.; MING-CHI, Y.; MING-LONG, T.; LI-KAI, C.; HER-HSIUNG, H. Formation of TiO₂ nano-network on titanium surface increases the human cell growth **Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials**, 2009.

CORREA, M. B.; PERES, M. A.; PERES, K. G.; HORTA, B. L.; GIGANTE, D. P.; DEMARCO, F. F. Life-course determinants of need for dental prostheses at age 24 **Journal of dental research**, 2010.

DAVID, M. D. E.; PAULO, G. C.; BYUNG-SOO, K.; YOUNG-TAEG, S.; TOMAS, A. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography **Trends in biotechnology**, 2010.

DAVID, W. P.; NADINE, B.; RAY, C. W. Risk Factors for Endosseous Dental Implant Failure **Dental Clinics of North America**, 2006.

DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing **J Dent Educ**, v.67, n.8, p.932-949, 2003.

DE GIGLIO, E.; COMETA, S.; CALVANO, C. D.; SABBATINI, L.; ZAMBONIN, P. G.; COLUCCI, S.; BENEDETTO, A. D.; COLAIANNI, G. A new titanium biofunctionalized interface based on poly(pyrrole-3-acetic acid) coating: proliferation of osteoblast-like cells and future perspectives **J Mater Sci Mater Med**, v.18, n.9, p.1781-1789, 2007.

DE JONGE, L.; LEEUWENBURGH, S.; WOLKE, J.; JANSEN, J. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces **Pharmaceutical research**, v.25, n.10, p.2357-2369, 2008.

DE JONGE, L.; LEEUWENBURGH, S. G.; WOLKE, J. C.; JANSEN, J. Organic-Inorganic Surface Modifications for Titanium Implant Surfaces **Pharmaceutical Research**, v.25, n.10, p.2357-2369, 2008.

DE WILD, M.; SCHUMACHER, R.; MAYER, K.; SCHKOMMODAU, E.; THOMA, D.; BREDELL, M.; KRUSE GUJER, A.; GRÄTZ, K. W.; WEBER, F. E. Bone regeneration by the osteoconductivity of porous titanium implants manufactured by selective laser melting: a histological and micro computed tomography study in the rabbit **Tissue engineering. Part A**, v.19, n.23-24, p.2645-2654, 2013.

DONARUMA, L. G. Definitions in biomaterials, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, 72 pp **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters**, v.26, n.9, p.414-414, 1988.

DVORAK, G.; ARNHART, C.; HEUBERER, S. Peri-implantitis and late implant failures in postmenopausal women: a cross-sectional study **Journal of clinical ...**, 2011.

EASTOE, J. E. Chemical aspects of the matrix concept in calcified tissue organisation **Calcified tissue research**, 1968.

ELEFThERIOS, T.; NEIL, U.; PETER, G. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, 2007.

ELENI, D. R. The social solution-denture esthetics, phonetics, and function **Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists**, 2009.

EMAMI, E.; DE SOUZA, R. F.; KABAWAT, M.; FEINE, J. S. The impact of edentulism on oral and general health **International journal of dentistry**, v.2013, p.498305, 2012.

FABBRO, M.; TESTORI, T.; FRANCETTI, L.; WEINSTEIN, R. Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.94, n.3, p.266, 2005.

FARIA, A. C.; ROSA, A. L.; RODRIGUES, R. C.; RIBEIRO, R. F. In vitro cytotoxicity of dental alloys and cpTi obtained by casting **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.85, n.2, p.504-508, 2008.

FRANK, M. J.; WALTER, M. S.; BUCKO, M. M.; PAMULA, E.; LYGSTADAAS, S. P.; HAUGEN, H. J. Polarization of modified titanium and titanium-zirconium creates nano-structures while hydride formation is modulated **Applied Surface Science**, v.282, p.7-16, 2013.

FRANK, M. J.; WALTER, M. S.; RUBERT, M.; THIEDE, B.; MONJO, M.; RESELAND, J. E.; HAUGEN, H. J.; LYGSTADAAS, S. P. Cathodic Polarization Coats Titanium Based Implant Materials with Enamel Matrix Derivate (EMD) **Materials**, v.7, n.3, p.2210-2228, 2014.

GAMONAL, J. A.; LOPEZ, N. J.; ARANDA, W. Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile **International Dental Journal**, 1998.

GASIK, M.; BRAEM, A.; CHAUDHARI, A.; DUYCK, J.; VLEUGELS, J. Titanium implants with modified surfaces: Meta-analysis of in vivo osseointegration **Materials Science and Engineering: C**, v.49, p.152-158, 2015.

GEETHA, M.; SINGH, A. K.; ASOKAMANI, R.; GOGIA, A. K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review **Progress in Materials ...**, 2009.

GENTILI, C.; CANCELEDDA, R. Cartilage and bone extracellular matrix **Curr Pharm Des**, v.15, n.12, p.1334-1348, 2009.

GHADA, A.; MARC, Q.; KATLEEN, M.; WIM, T.; ARNOŠT, K.; DANIEL VAN, S. Impact of local and systemic factors on the incidence of failures up to abutment connection with modified surface oral implants **Journal of Clinical Periodontology**, 2008.

GITTENS, R.; SCHEIDELER, L.; RUPP, F.; HYZY, S.; GEIS-GERSTORFER, J.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects **Acta biomaterialia**, 2014.

GLADIUS, L. Properties of open-cell porous metals and alloys for orthopaedic applications **Journal of materials science. Materials in medicine**, 2013.

GOLDSTEIN, J. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis: Third Edition**. Springer US, 2003.

GOMEZ-FLORIT, M.; XING, R.; RAMIS, J. M.; TAXT-LAMOLLE, S.; HAUGEN, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; MONJO, M. Human gingival fibroblasts function is stimulated on machined hydrided titanium zirconium dental implants **Journal of Dentistry**, v.42, n.1, p.30-38, 2014.

GOTO, T. Osseointegration and dental implants **Clinical calcium**, v.24, n.2, p.265-271, 2014.

GRASSI, S.; PIATTELLI, A.; DE FIGUEIREDO, L.; FERES, M.; DE MELO, L.; IEZZI, G.; ALBA, R.; SHIBLI, J. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces **Journal of periodontology**, v.77, n.10, p.1736-1743, 2006.

GUIDO, H.; DAVID, L.; MANAL, A. A.; JAMES, P. L.; JOCELYNE, S. F. Oral and general health-related quality of life with conventional and implant dentures **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, 2003.

GUPTA, R.; CHAUDHURY, N. K. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects **Biosensors and Bioelectronics**, 2007.

GUPTA, R.; KUMAR, A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology **Biomedical materials (Bristol, England)**, v.3, n.3, p.34005, 2008.

H. PODBIELSKA, A. U.-J. Z. Sol-gel technology for biomedical engineering **BULLETIN OF THE POLISH ACADEMY OF SCIENCES**, v.54, n.3, 2005.

HADDOW, D. B.; KOTHARI, S.; JAMES, P. F.; SHORT, R. D.; HATTON, P. V.; VAN NOORT, R. Synthetic implant surfaces. 1. The formation and characterization of sol-gel titania films **Biomaterials**, v.17, n.5, p.501-507, 1996.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone Remodeling **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2006.

HAYES, J. S.; RICHARDS, R. G. Surfaces to control tissue adhesion for osteosynthesis with metal implants: in vitro and in vivo studies to bring solutions to the patient **Expert Rev Med Devices**, v.7, n.1, p.131-142, 2010.

HAYES, J. S.; RICHARDS, R. G. The use of titanium and stainless steel in fracture fixation **Expert Rev Med Devices**, v.7, n.6, p.843-853, 2010.

HENCH, L. L.; ETHRIDGE, E. C. **Biomaterials: An Interfacial Approach**. Acad. Press, 1982.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. World Scientific, 1998.
 HERRMANN, I.; LEKHOLM, U.; HOLM, S.; KULTJE, C. Evaluation of patient and implant characteristics as potential prognostic factors for oral implant failures **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.20, n.2, p.220-230, 2005.

HEYDECKE, G.; KOHAL, R.; GLÄSER, R. Optimal esthetics in single-tooth replacement with the Re-Implant system: a case report **International Journal of Prosthodontics**, v.12, n.2, 1999.

HOSAKA, M.; SHIBATA, Y.; MIYAZAKI, T. Preliminary beta-tricalcium phosphate coating prepared by discharging in a modified body fluid enhances collagen immobilization onto titanium **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, v.78B, n.2, p.237-242, 2006.

HONKALA, K. Tailoring oxide properties: An impact on adsorption characteristics of molecules and metals **Surface Science Reports**, v.69, n.4, p.366-388, 2014.

HUANG, Y.; HAN, S.; PANG, X.; DING, Q.; YAN, Y. Electrodeposition of porous hydroxyapatite/calcium silicate composite coating on titanium for biomedical applications **Applied Surface Science**, v.271, n.0, p.299-302, 2013.

INES, P.; MARTIN, S.; FRAUKE, M.; REINER, B. Edentulism as part of the general health problems of elderly adults **International dental journal**, 2010.

JEFFCOAT, M. The association between osteoporosis and oral bone loss **J Periodontol**, v.76, n.11 Suppl, p.2125-2132, 2005.

JIN, C.; REN, L.-F. F.; DING, H.-Z. Z.; SHI, G.-S. S.; LIN, H.-S. S.; ZHANG, F. Enhanced attachment, proliferation, and differentiation of human gingival fibroblasts on titanium surface modified with biomolecules **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v.100, n.8, p.2167-2177, 2012.

JOHN, D. C. Bone architecture and fracture **Current Osteoporosis Reports**, 2005.

JUNG, Y. C.; HAN, C. H.; LEE, I. S.; KIM, H. E. Effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the osseointegration of endosseous implants in rabbit tibiae **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.16, n.6, p.809-818, 2001.

KASEMO, B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects **The Journal of prosthetic dentistry**, v.49, n.6, p.832-837, 1983.

KAUS, T.; PRÖBSTER, L.; WEBER, H. Clinical follow-up study of ceramic veneered titanium restorations--three-year results **The International journal of prosthodontics**, v.9, n.1, p.9-15, 1996.

KHAN, K. S.; KUNZ, R. Five steps to conducting a systematic review v.96, n.3, p.118-121, 2003.

KIM, K.-H.; RAMASWAMY, N. Electrochemical surface modification of titanium in dentistry **Dental Materials Journal**, v.28, n.1, p.20-36, 2009.

KENRY; LIM, C. Biocompatibility and Nanotoxicity of Layered Two-Dimensional Nanomaterials **ChemNanoMat**, v.3, n.1, p.5-16, 2017.

LAMOLLE, S. F.; MONJO, M.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; HAUGEN, H. J. Titanium implant surface modification by cathodic reduction in hydrofluoric acid: surface characterization and in vivo performance **J Biomed Mater Res A**, v.88, n.3, p.581-588, 2009.

LE GUÉHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration **Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials**, v.23, n.7, p.844-854, 2007.

LE GUÉHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration **Dental Materials**, v.23, n.7, p.844-854, 2007.

LIANG, Y.; LI, H.; XU, J.; LI, X.; QI, M.; HU, M. Morphology, composition, and bioactivity of strontium-doped brushite coatings deposited on titanium implants via electrochemical deposition **Int J Mol Sci**, v.15, n.6, p.9952-9962, 2014.

LILJA, M.; GENVAD, A.; ASTRAND, M.; STRØMME, M.; ENQVIST, H. Influence of microstructure and chemical composition of sputter deposited TiO₂ thin films on in vitro bioactivity **Journal of materials science. Materials in medicine**, v.22, n.12, p.2727-2734, 2011.

LIMIN, S.; CHRISTOPHER, C. B.; KARLIS, A. G.; AHMET, K. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review **Journal of Biomedical Materials Research**, 2001.

LIU, X.; LIM, J. Y.; DONAHUE, H. J.; DHURJATI, R.; MASTRO, A. M.; VOGLER, E. A. Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro **Biomaterials**, v.28, n.31, p.4535-4550, 2007.

MA, M.; YE, W.; WANG, X.-X. Effect of supersaturation on the morphology of hydroxyapatite crystals deposited by electrochemical deposition on titanium **Materials Letters**, v.62, n.23, p.3875-3877, 2008.

MARKS, S. C., JR.; POPOFF, S. N. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton **Am J Anat**, v.183, n.1, p.1-44, 1988.

MARY, L. B. Bone quality: where do we go from here? **Osteoporosis International**, 2003.

MCLAUGHLIN, R. P.; BENNETT, J. C.; TREVISI, H. J. Systemized orthodontic treatment mechanics. Elsevier Health Sciences, 2001.

MASSARO, C.; ROTOLO, P.; DE RICCARDIS, F.; MILELLA, E.; NAPOLI, A.; WIELAND, M.; TEXTOR, M.; SPENCER, N. D.; BRUNETTE, D. M. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.13, n.6, p.535-548, 2002.

MATSUI, Y.; OHNO, K.; MICHII, K.-I.; YAMAGATA, K. Experimental Study of High-Velocity Flame-Sprayed Hydroxyapatite Coated and Noncoated Titanium Implants **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.9, n.4, 1994.

MAURER, A. M.; MERRITT, K.; BROWN, S. A. Cellular uptake of titanium and vanadium from addition of salts or fretting corrosion in vitro **J Biomed Mater Res**, v.28, n.2, p.241-246, 1994.

MCINTIRE, L. V.; CENTER, W. T. E. **WTEC Panel on Tissue Engineering Research: Final Report**. Academic Press, 2003.

MILLER, S. C.; JEE, W. S. The bone lining cell: a distinct phenotype? **Calcified tissue international**, 1987.

MUELLER, K. F.; BRIEL, M.; STRECH, D.; MEERPOHL, J. J.; LANG, B.; MOTSCHALL, E.; GLOY, V.; LAMONTAGNE, F.; BASSLER, D. Dissemination bias in systematic reviews of animal research: a systematic review **PLoS One**, v.9, n.12, p.e116016, 2014.

NARAYANAN, R.; KWON, T. Y.; KIM, K. H. Preparation and characteristics of nano-grained calcium phosphate coatings on titanium from ultrasonated bath at acidic pH **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.85, n.1, p.231-239, 2008.

NARAYANAN, R.; SESHADRI, S. K.; KWON, T. Y.; KIM, K. H. Electrochemical nano-grained calcium phosphate coatings on Ti-6Al-4V for biomaterial applications **Scripta Materialia**, v.56, n.3, p.229-232, 2007.

NIINOMI, M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v.1, n.1, p.30-42, 2008.

NIINOMI, M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. **J Mech Behav Biomed Mater**, v.1, n.1, p.30-42, 2008.

NOORT, R. V. **Introduction to Dental Materials**. 4 Edition.ed. MOSBY Elsevier, 2013.
 OSHIDA, Y. **Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials**. Elsevier, 2006.
 OU, K.-L.; LIN, C.-T.; CHEN, S.-L.; HUANG, C.-F.; CHENG, H.-C.; YEH, Y.-M.; LIN, K.-H. Effect of multi-nano-titania film on proliferation and differentiation of mouse fibroblast cell on titanium **Journal of the Electrochemical Society**, v.155, n.6, p.E79-E84, 2008.

NOURI, A.; WEN, C. Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials Part One: Fundamentals of surface coating and modification of metallic biomaterials, 2015.

PACHAURI, P.; BATHALA, L. R.; SANGUR, R. Techniques for dental implant nanosurface modifications **J Adv Prosthodont**, v.6, n.6, p.498-504, 2014.

PARR, G.; GARDNER, L.; TOTH, R. Titanium: the mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspects **The Journal of prosthetic dentistry**, v.54, n.3, p.410-414, 1985.

PEARCE, A. I.; PEARCE, S. G.; SCHWIEGER, K.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; ARCHER, C. W.; RICHARDS, R. G. Effect of surface topography on removal of cortical bone screws in a novel sheep model **J Orthop Res**, v.26, n.10, p.1377-1383, 2008.

PENG, P.; KUMAR, S.; VOELCKER, N. H.; SZILI, E.; SMART, R. S. C.; GRIESSER, H. J. Thin calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition in modified simulated body fluid **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.76A, n.2, p.347-355, 2006.

PEREL, P.; ROBERTS, I.; SENA, E.; WHEBLE, P.; BRISCOE, C.; SANDERCOCK, P.; MACLEOD, M.; MIGNINI, L. E.; JAYARAM, P.; KHAN, K. S. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review **Bmj**, v.334, n.7586, p.197, 2007.

PETER, G.; SPYRIDON, P.; GEORGE, K. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature **Injury**, 2007.

PETERS, J. L.; SUTTON, A. J.; JONES, D. R.; RUSHTON, L.; ABRAMS, K. R. A systematic review of systematic reviews and meta-analyses of animal experiments with guidelines for reporting **J Environ Sci Health B**, v.41, n.7, p.1245-1258, 2006.

PETERSEN, P. E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme **Community Dent Oral Epidemiol**, v.31 Suppl 1, p.3-23, 2003.

PETERSEN, P. E.; YAMAMOTO, T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme **Community Dent Oral Epidemiol**, v.33, n.2, p.81-92, 2005.

PHAN, T. C. A.; XU, J.; ZHENG, M. H. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease **Murcia: F. Hernández**, 2004.

PONZ, E.; LADAGA, J. L.; BONETTO, R. D. Measuring surface topography with scanning electron microscopy. I. EZEImage: a program to obtain 3D surface data **Microsc Microanal**, v.12, n.2, p.170-177, 2006.

PRADO DA SILVA, M. H.; SOARES, G. D.; ELIAS, C. N.; BEST, S. M.; GIBSON, I. R.; DISILVIO, L.; DALBY, M. J. In vitro cellular response to titanium electrochemically coated with hydroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness **J Mater Sci Mater Med**, v.14, n.6, p.511-519, 2003.

PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface **Biomaterials**, 1999.

QUIRYNEN, M.; VOGELS, R.; PEETERS, W.; VAN STEENBERGHE, D.; NAERT, I.; HAFFAJEE, A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets **Clin Oral Implants Res**, v.17, n.1, p.25-37, 2006.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling **J Biol Chem**, v.285, n.33, p.25103-25108, 2010.

RAHAL, M. D.; BRANEMARK, P. I.; OSMOND, D. G. Response of bone marrow to titanium implants: osseointegration and the establishment of a bone marrow-titanium interface in mice **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.8, n.5, p.573-579, 1993.

RAIKAR, G. N. Surface characterization of titanium implants **Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films**, v.13, 1995.

RAJWANT, S. B.; DEREK, E. B.; LAURA, P. Z.; YUSHAN, Y. Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants **Acta biomaterialia**, 2009.

RICHARDS, R. G.; MORIARTY, T. F.; THEODORE, M.; ROBERT, T. M.; DAVID, W. G. Advances in biomaterials and surface technologies **Journal of orthopaedic trauma**, 2012.

ROHANIZADEH, R.; LEGEROS, R. Z.; HARSONO, M.; BENDAVID, A. Adherent apatite coating on titanium substrate using chemical deposition **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2005.

SB, M. D. S. Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa nacional de saúde bucal revela importante redução da cárie dentária no país / National oral health survey in 2010 shows a major decrease in dental caries in Brazil **Biblioteca Virtual em Saude**, v.27, n.1, p.4-5, 2012.

SCHELLER, E. L.; VILLA-DIAZ, L. G.; KREBSBACH, P. H. Gene therapy: implications for craniofacial regeneration **The Journal of craniofacial surgery**, v.23, n.1, p.333-337, 2012.

SCHUTZ, R.; WATKINS, H. Recent developments in titanium alloy application in the energy industry **Materials Science and Engineering: A**, v.243, n.1, p.305-315, 1998.

SCHWARTZ, J.; AVALTRONI, M. J.; DANAHY, M. P.; SILVERMAN, B. M.; HANSON, E. L.; SCHWARZBAUER, J. E.; MIDWOOD, K. S.; GAWALT, E. S. Cell attachment and spreading on metal implant materials **Materials Science and Engineering: C**, v.23, n.3, p.395-400, 2003.

SHIRKHAZADEH, M. Direct formation of nanophase hydroxyapatite on cathodically polarized electrodes **J Mater Sci Mater Med**, v.9, n.2, p.67-72, 1998.

SJÖSTRÖM, T.; BRYDONE, A. S.; MEEK, R. M.; DALBY, M. J.; SU, B.; MCNAMARA, L. E. Titanium nanofeaturing for enhanced bioactivity of implanted orthopedic and dental devices **Nanomedicine (London, England)**, v.8, n.1, p.89-104, 2013.

SKORB, E. V.; ANDREEVA, D. V. Surface Nanoarchitecture for Bio-Applications: Self-Regulating Intelligent Interfaces **Advanced Functional Materials**, v.23, n.36, p.4483-4506, 2013.

STADLINGER, B.; POURMAND, P.; LOCHER, M. C.; SCHULZ, M. C. Systematic review of animal models for the study of implant integration, assessing the influence of material, surface and design **J Clin Periodontol**, v.39 Suppl 12, p.28-36, 2012.

STEINEMANN, S. Titanium--the material of choice? **Periodontology 2000**, v.17, p.7-21, 1998.

SUBRAMANIAM, M.; JALAL, S. M.; RICKARD, D. J.; HARRIS, S. A.; BOLANDER, M. E.; SPELSBERG, T. C. Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER alpha cells: bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization **J Cell Biochem**, v.87, n.1, p.9-15, 2002.

SUL, Y.-T.; JOHANSSON, C.; PETRONIS, S.; KROZER, A.; JEONG, Y.; WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition **Biomaterials**, v.23, n.2, p.491-501, 2002.

SYKARAS, N.; IACOPINO, A. M.; MARKER, V. A.; TRIPLETT, R. G.; WOODY, R. D. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.15, n.5, p.675-690, 2000.

TAO, Z.-S.; ZHOU, W.-S.; HE, X.-W.; LIU, W.; BAI, B.-L.; ZHOU, Q.; HUANG, Z.-L.; TU, K.-K.; LI, H.; SUN, T.; LV, Y.-X.; CUI, W.; YANG, L. A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats **Materials Science & Engineering. C, Materials For Biological Applications**, v.62, p.226-232, 2016.

TAXT-LAMOLLE, S. F.; RUBERT, M.; HAUGEN, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; MONJO, M. Controlled electro-implementation of fluoride in titanium implant surfaces enhances cortical bone formation and mineralization **Acta Biomater**, v.6, n.3, p.1025-1032, 2010.

TOMAS, A.; LARS, S.; ANN, W. State of the art of oral implants **Periodontology** 2000, 2008.

VAN VELZEN, F. J.; OFEC, R.; SCHULTEN, E. A.; TEN BRUGGENKATE, C. M. 10-year survival rate and the incidence of peri-implant disease of 374 titanium dental implants with a SLA surface: a prospective cohort study in 177 fully and partially edentulous patients **Clin Oral Implants Res**, 2014.

VINCENT, L.; FRANK, L. T.; LARRY, D. G.; CAROLYN, R. C.; LARRY, J. S. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling **Journal of theoretical biology**, 2004.

VASCONCELOS, D. M.; SANTOS, S. G.; LAMGHARI, M.; BARBOSA, M. A. The two faces of metal ions: From implants rejection to tissue repair/regeneration **Biomaterials**, v.84, p.262-275, 2016.

WALTER, M. S.; FRANK, M. J.; SATUE, M.; MONJO, M.; RONOLD, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; HAUGEN, H. J. Bioactive implant surface with electrochemically bound doxycycline promotes bone formation markers in vitro and in vivo **Dental Materials**, v.30, n.2, p.200-214, 2014.

WINFIELD, J. B.; MIMURA, T. Pathogenetic significance of anti-lymphocyte autoantibodies in systemic lupus erythematosus **Clin Immunol Immunopathol**, 1992.

X, L. I. U.; P, C. H. U.; C, D. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v.47, 2004.

XIHUA, S.; JORGE, A. C.-A.; YANG, C.; ZHENG, Z.; MICHAEL, A. B.; JOHN, D. B. Properties of Human Serum Albumin Entrapped in Sol-Gel-Derived Silica Bearing Covalently Tethered Sugars **Chemistry of Materials**, 2005.

XING, R.; SALOU, L.; TAXT-LAMOLLE, S.; RESELAND, J. E.; LYGSTADAAS, S. P.; HAUGEN, H. J. Surface hydride on titanium by cathodic polarization promotes human gingival fibroblast growth **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.102, n.5, p.1389-1398, 2014.

YAIR, S.; HADI, A.; ERAN, R.; YORAM, Z.; ILAN, K.; DAN, G.; ZULMA, G. Maxillofacial-derived stem cells regenerate critical mandibular bone defect **Tissue engineering. Part A**, 2008.

YAO, C.; SLAMOVICH, E. B.; WEBSTER, T. J. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures **Journal of biomedical materials research. Part A**, v.85, n.1, p.157-166, 2008.

YEO, I. S. Reality of dental implant surface modification: a short literature review **Open Biomed Eng J**, v.8, p.114-119, 2014.

YOKOYAMA, K. I.; ICHIKAWA, T.; MURAKAMI, H.; MIYAMOTO, Y.; ASAOKA, K. Fracture mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implant **Biomaterials**, v.23, n.12, p.2459-2465, 2002.

YORUC; HAZAR, A. B.; #220; LAY; #160; O.; SENER; #160; C., B. **Examination of the properties of Ti-6Al-4V based plates after oral and maxillofacial application**. Bucuresti:Series INOE 2000, 2007. 7p.

YOSHIMITSU, O.; EMIKO, G. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro **Biomaterials**, 2005.

YOUNG-TAEG, S.; CARINA, B. J.; SARUNAS, P.; ANATOL, K.; YONGSOO, J.; ANN, W.; TOMAS, A. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition **Biomaterials**, 2002.

YOUNG-TAEG, S.; JÖNSSON, J.; GOUI-SEONG, Y.; JOHANSSON, C. Resonance frequency measurements in vivo and related surface properties of magnesium-incorporated, micropatterned and magnesium-incorporated TiUnite®, Osseotite®, SLA® and TiOblast® implants **Clinical Oral Implants Research**, v.20, n.10, p.1146-1155, 2009.

ZHANG, Q.; LENG, Y.; LU, X.; XIN, R.; YANG, X.; CHEN, J. Bioactive films on metallic surfaces for osteoconduction **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.88A, n.2, p.481-490, 2009.

4 Relatório do trabalho de campo

4.1 Modificações no Projeto de Pesquisa

O projeto foi apresentado junho 2014 sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho sob a modalidade de Defesa Fechada (Patente), posteriormente em agosto de 2014 foi solicitada a substituição de orientador por afastamento do Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho à Universidade de Passo Fundo por motivos de trabalho, assumindo a orientação o Prof. Dr. Neftali Lenin Villarreal Carreño.

Neste contexto foram consideradas algumas mudanças no planejamento do trabalho laboratorial em relação às caracterizações, microestruturas e preparação das soluções para as deposições, que serão descritas e apresentadas no relatório de campo. Foram também incluídas e definidas a elaboração de uma revisão sistemática da literatura relacionada com a técnica de deposição de polarização catódica eletroquímica.

4.2. Relatório do Trabalho de Campo

O presente relatório é parte integrante da Tese de doutorado apresentado ao programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, UFPel, intitulado “Revestimentos biomiméticos para superfície de titânio em aplicações biomédicas”.

Este trabalho faz parte integrante do estudo multidisciplinar da Faculdade de Odontologia da UFPel e obteve no ano de 2015 financiamento através do edital CHAMADA UNIVERSAL MCTI/CNPq Nº 14/2014- Processo: 458332/2014-3, Faixa B - de R\$60.00,00 e valor aprovado de R\$42.000,00, através do projeto intitulado “Revestimentos biomiméticos para superfície de titânio em aplicações biomédicas”.

Proponente: Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio

Co-proponentes: Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco, Prof. Dr. Neftali Lenin Villarreal Carreño, Prof. Dr. César O. Avellaneda, Prof. Dr. Vinicius Farias Campos, e Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho.

4.2.1. Desenvolvimento da Pesquisa laboratorial

Com base na definição do projeto foram reestruturados os fluxogramas da preparação e caracterizações de superfícies biomiméticos- titânio, figura 1, e os grupos experimentais das etapas do estudo, figura 2, do projeto, com base principalmente, na disponibilidade de equipamentos para a realização das caracterizações, material do Laboratório e a reagentes para a preparação das amostras, na medida em que se realizaram os pedidos dos reagentes.

Os fluxogramas foram redefinidos e estão apresentados na figura 1 e figura 2 do capítulo 4 relatórios de campo.

Os grupos experimentais, com as características metodológicas e reagentes usados estão apresentados na tabela 1.

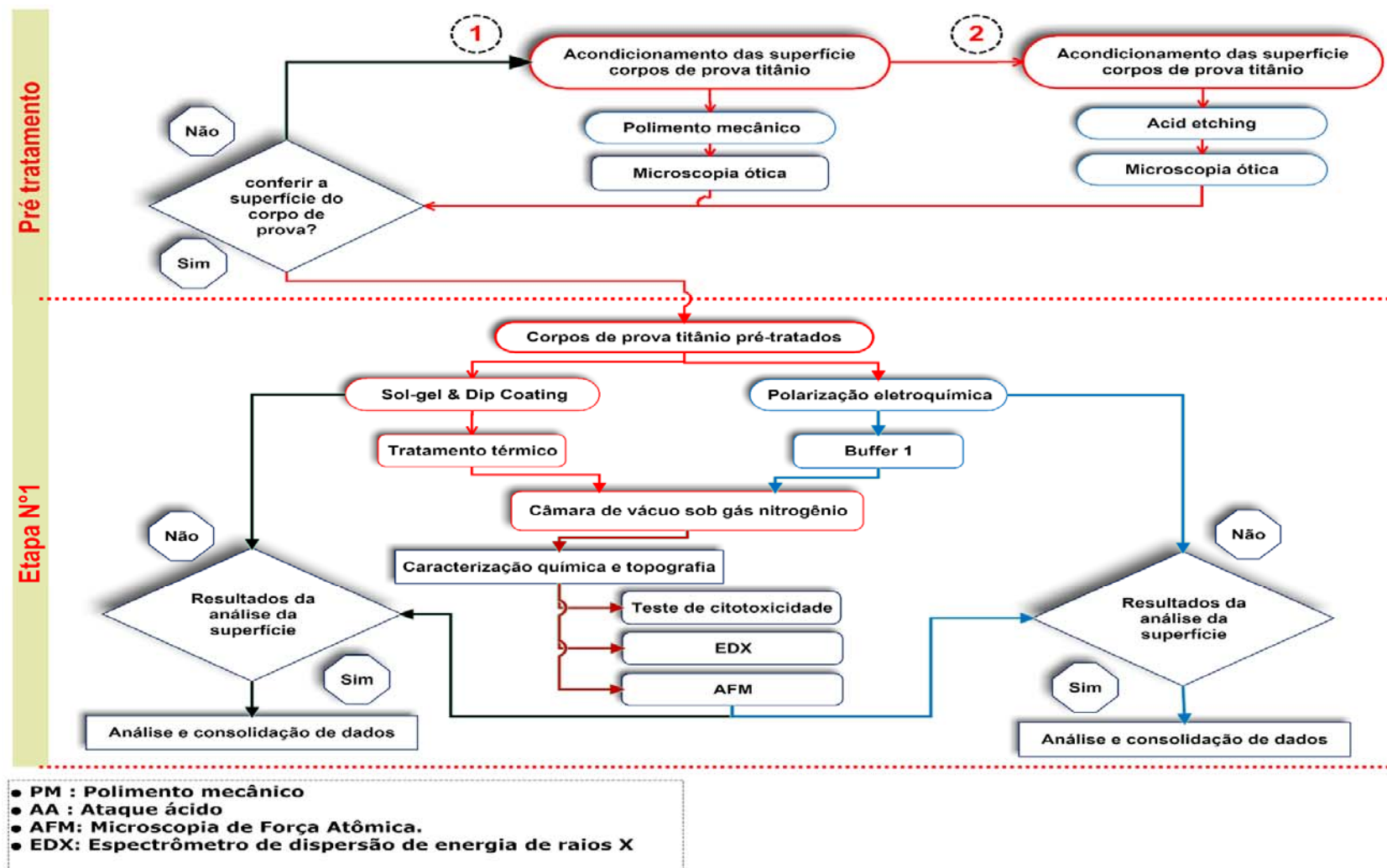


Figura 1 - Fluxograma da preparação e caracterizações de superfícies biomiméticas. Fonte: Autor

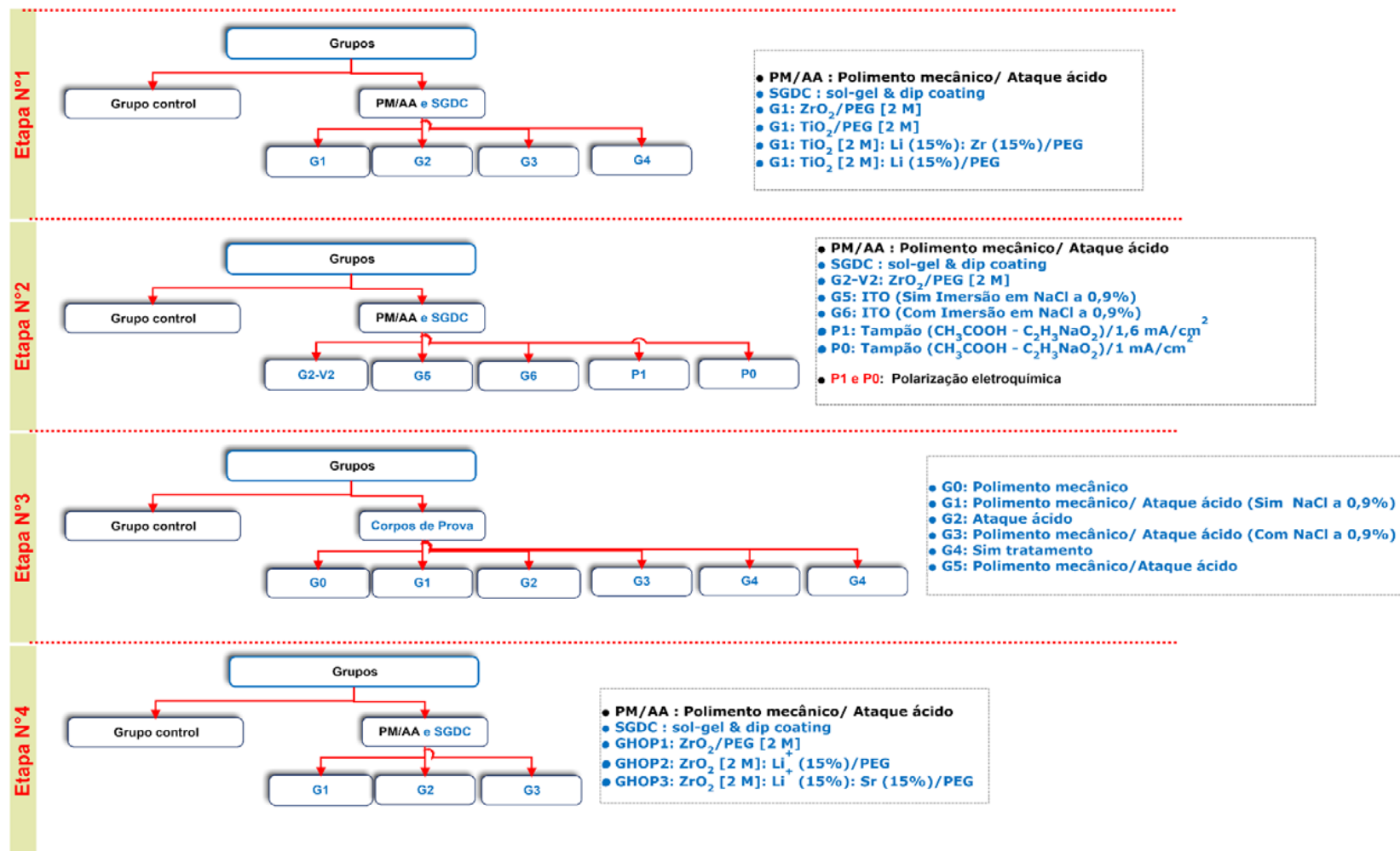


Figura 2 - Grupos experimentais das etapas do estudo. Fonte: Autor

Tabela 1 - Resumo dos grupos experimentais e as condições de deposição dos revestimentos pelo processo sol-gel dip-coating e polarização catódica sobre superfícies de Ti.

Grupo	Pré-tratamento de superfícies		Síntese do gel/Tampão	Parâmetros de configuração dos equipamentos		Técnica de deposição	Nº de figura Fluxogram a de síntese
	Polimento mecânico	Ataque ácido		Configuração equipamento	Tratamento térmico		
Etapa 1							
G1	Com	Com	ZrO ₂ /PEG [0,2 M]	35 cm/min	45°C / 24 horas	Dip-coating	Figura 10
G2	Com	Com	TiO ₂ /PEG [0,2 M]	35 cm/min	45°C / 24 horas	Dip-coating	Figura 13
G3	Com	Com	TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%): Zr (15%)/PEG	35 cm/min	45°C / 24 horas	Dip-coating	Figura 14
G4	Com	Com	TiO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG	35 cm/min	45°C / 24 horas	Dip-coating	Figura 15
Etapa 2							
G2-V2	Com	Com	ZrO ₂ /PEG [0,2 M]	35 cm/min	40°C / 24 horas	Dip-coating	Figura 10
G5	Com	Sem NaCl-0,9%	ITO[0,25 M]	38 cm/min	150°C/ 30 min	Dip-coating	Figura 16
G6	Com	Com NaCl-0,9%	ITO[0,25 M]	20 cm/min	150°C/ 30 min	Dip-coating	Figura 16
P1	Com	Com	Tampão CH ₃ COOH - C ₂ H ₃ NaO ₂	3 pH / 8 horas / 1,6 mA/cm ²		Polarização catódica	Figura 21
Etapa 3							
G0	Com	-	Polimento mecânico	-	-	-	Figura 5
G1	Com	Sem NaCl-0,9%	Polimento mecânico/ Ataque ácido	-	-	-	-
G2	-	Com	Ataque ácido	-	-	-	Figura 6
G3	Com	Com NaCl-0,9%	Polimento mecânico/ Ataque ácido	-	-	-	-
G4	-	-	Sem tratamento	-	-	-	-
G5	Com	Com	Polimento mecânico/Ataque ácido	-	-	-	Figura 4 e 6

Grupo	Pré-tratamento de superfícies		Síntese do gel/Tampão	Parâmetros de configuração dos equipamentos		Técnica de deposição	Nº de figura
	Polimento mecânico	Ataque ácido		Configuração equipamento	Tratamento térmico		Fluxograma de síntese
Etapa 4							
GHOP1	Sim	Sim	ZrO ₂ /PEG [0,2 M]	15 cm/min	40°C / 24 horas	Dip-coating	Figura 10
GHOP2	Sim	Sim	ZrO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG	25 cm/min	40°C / 24 horas	Dip-coating	Figura 18
GHOP3	Sim	Sim	ZrO ₂ [0,2 M]: Li ⁺ (15%): Sr (15%)/PEG	35 cm/min	40°C / 24 horas	Dip-coating	Figura 19

4.2.1. Preparação corpos de prova de titânio pelo pré-tratamento de polimento mecânico

Os corpos de prova foram obtidos a partir de TI F67 GR2 #2,25 MM - UNS R50400 na forma original de chapas retangulares, cortados em dimensões de 1x1 cm² e 2,25 mm de espessura (Figura 3).

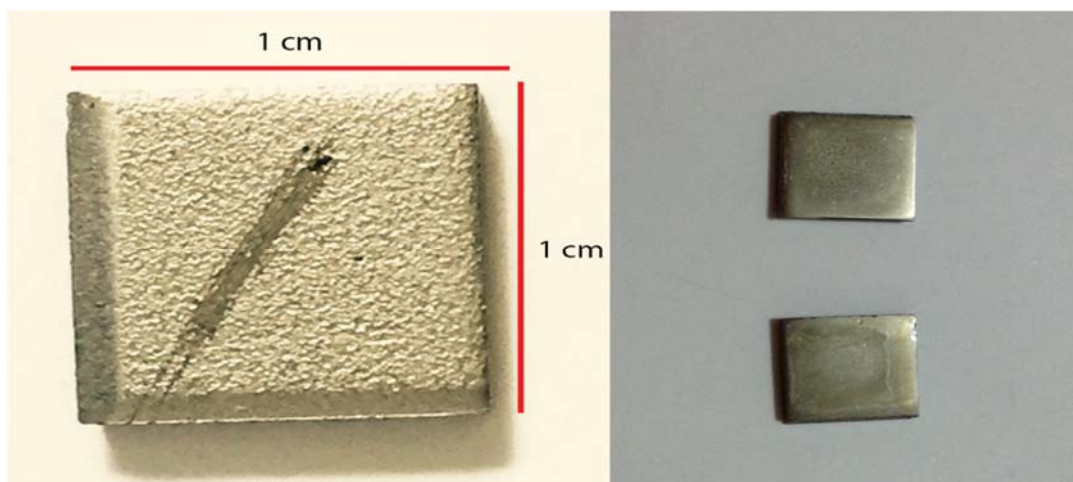


Figura 3 - Confeção dos corpos de prova de titânio. Fonte: O autor

Todos os corpos de prova foram medidos e uma das superfícies tratadas por polimento mecânico gradual mediante uso de lixas com granulações diferentes, como pode ser observado na Tabela 2. O polimento mecânico é um método que permite a remoção de parte do material da superfície ou impurezas geralmente usando um abrasivo duro (ELLINGSEN; THOMSEN; LYNGSTADAAS, 2006). O polimento da superfície em titânio precisou da utilização de um material abrasivo fino como papel abrasivo que é aplicado a uma roda flexível ou uma correia e então o corpo de prova de titânio é colocado em contato direto com a superfície abrasiva. O polimento é sempre realizado na presença de lubrificante (WENNERBERG; ALBREKTSSON; LAUSMAA, 1996).

Tabela 2 - Materiais utilizados no pré-tratamento polimento mecânico

Reagentes	Fórmula molecular	Marca
Alumina desaglomerada	Granulação 1 µm	Allied High Tech
Lixas de carbeto de silício	600, 1200, e 2000 mesh	Sigma aldrich
Gás Nitrogênio	N ₂	Sigma aldrich
Água destilada	H ₂ O	-
Acetona	C ₃ H ₆ O	Sigma aldrich
Álcool etílico	C ₂ H ₆ O	Sigma aldrich

Durante a fase de produção ou análise de materiais, torna-se necessário analisar a sua microestrutura. Esta análise microestrutural é importante, pois permite entender as correlações entre a microestrutura e defeitos e as propriedades mecânicas e biológicas e ainda prever as propriedades do material quando estas correlações são estabelecidas.

As fases do processo de polimento estão apresentadas na Figura 4. Como descrito na figura 4, na fase-1 os corpos de prova foram selecionados baseados nos grupos definidos segundo as técnicas de deposição programadas. Para a análise micrográfica foram realizadas metalografias em três direções na liga de titânio, com o intuito de certificar a direção de laminação dos materiais recebido e eliminar a rugosidade do produto original. Assim, primeiramente foi parametrizado o equipamento Politriz / Lixadeira metalográfica modelo Aropol-E marca ARATEC, com a velocidade da roda de rotação de 200 rpm, e polidas em lixas ou papel abrasivo de lixas de carbeto de silício na sequência 200, 400, 600, 800, 1200 e 2000, na sequência mais adequada de lixas para o trabalho metalográfico para corpos de prova de titânio (LAUSMAA, 2001), para cada 4 corpos de prova foram trocadas as lixas, cada amostra foi submetida ao polimento mecânico com lixas de carbeto de silício com granulações de 200, 400, 600, 800, 1200 e 2000 mesh respectivamente por 2 minutos cada, e com acabamento (polimento ou polimento e lustragem) sob Alumina desaglomerada de granulação 1 µm, 5 minutos cada.

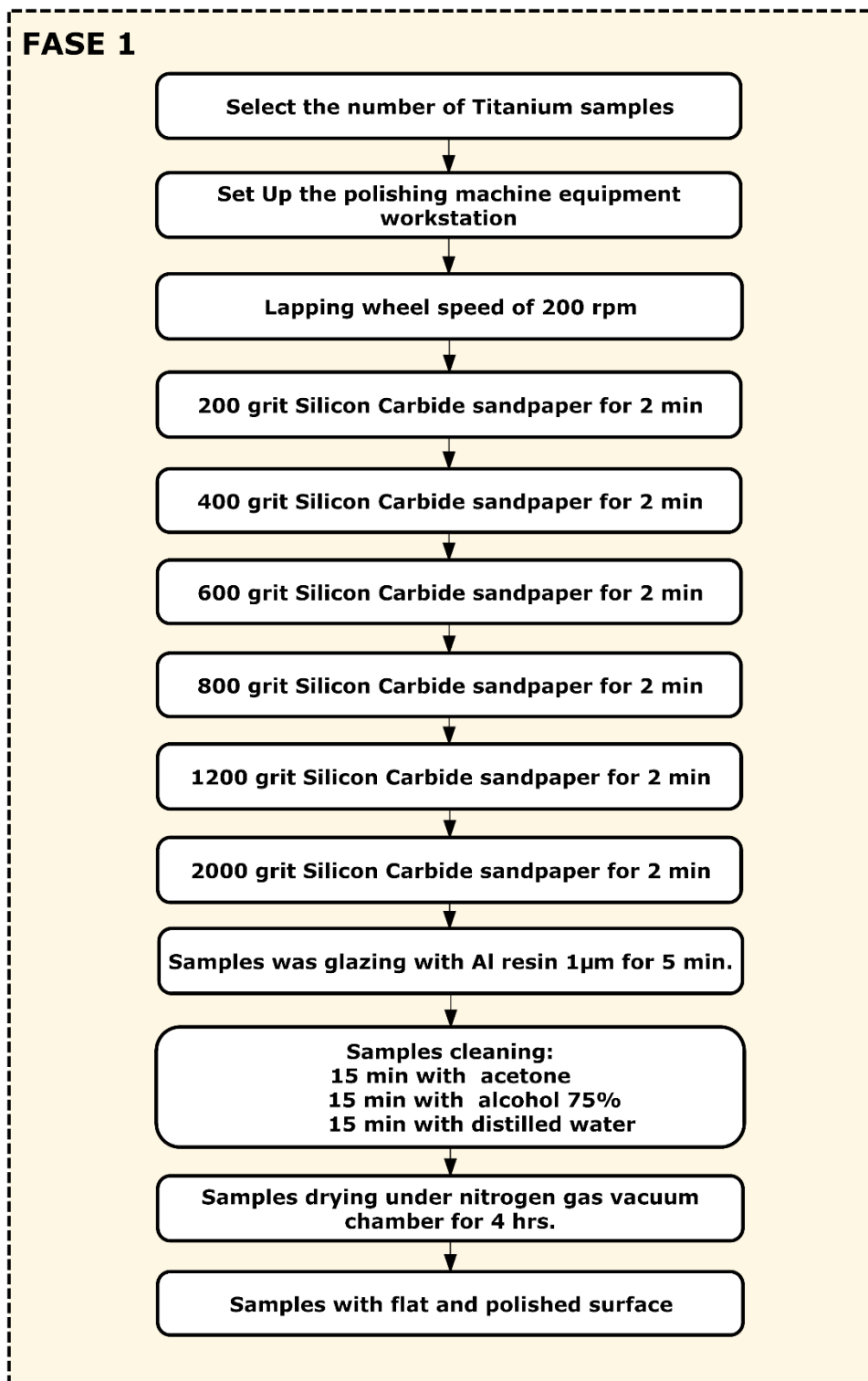


Figura 4 - Fluxograma de pré-tratamento polimento mecânico. Fonte: O autor

Após o procedimento de polimento mecânico, todos os corpos de prova foram lavados com acetona, álcool a 75% e água destilada por um período de tempo de 15 minutos cada grupo de corpos de prova, e finalmente as amostras foram submetidas à secagem numa câmara de vácuo sob gás nitrogênio durante 4 horas. Este procedimento permitiu obter uma superfície plana e polida, adequada para proceder aos diversos ensaios, como pode ser observado na Figura 5 e Figura 6.

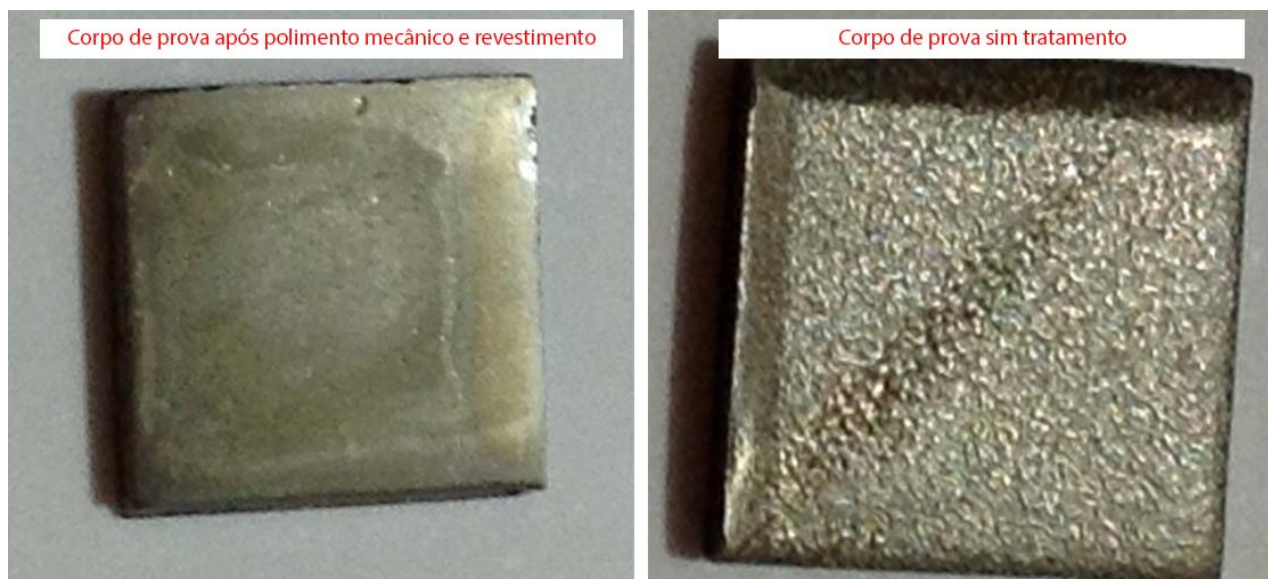


Figura 5 - Corpos de prova após pré-tratamento de polimento mecânico e revestimento
Fonte: O autor

4.2.2. Preparação amostras de titânio pelo pré-tratamento correção ácida

O titânio por natureza é resistente à corrosão, contudo, submetido a ataque ácido pode criar porosidade removendo quantidades pequenas de material, resultando na modificação da superfície (KOHLES et al., 2004, LAUSMAA, 2001).

Foi realizado o pré-tratamento ácido das amostras mediante o uso de diversos ácidos, apresentados na Tabela 3. Um pré-tratamento ácido é frequentemente utilizado para a remoção de óxidos e contaminantes, com o intuito de se obter uma superfície limpa e uniforme. O tratamento de superfície por ataque ácido é realizado por subtração, sob a aplicação de diferentes ácidos principalmente (Sulfúrico, clorídrico, nítrico, fluorídrico e combinações) sobre a superfícies de titânio, promove-se rugosidade

micrométrica $\sim 1,3 \mu\text{m}$ (microporosidade), que por sua vez promove a osseointegração (KOHLES, et al., 2004). Na técnica de ataque ácido a concentração, temperatura e o tempo de aplicação do ácido determinam o grau de rugosidade (KOHLES, et al., 2004, SITTIG et al., 1999, WENNERBERG; ALBREKTSSON; ANDERSSON, 1996). Neste sentido, os procedimentos de ataques ácidos com a combinação de ácidos compostos (KOHLES, et al., 2004, SITTIG, et al., 1999) proporcionam e promovem a formação de rugosidades e topografias específicas com a capacidade de estimular a adesão de células osteogênicas e consequentemente promover a aposição óssea (LE GUÉHENNEC et al., 2007).

Tabela 3 - Materiais utilizadas no pré-tratamento correção ácida.

Reagentes	Formula	Marca
Ácido clorídrico	HCl	Sigma aldrich
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Sigma aldrich
Gás Nitrogênio	N ₂	Sigma aldrich
Cloreto de sódio	NaCl 0,9%	Sigma aldrich
Água destilada	H ₂ O	-

A figura 6 apresenta as fases referente aos processos de tratamento ácido. Como descrito no fluxograma da figura 6 na fase 2, foram preparados numa placa petri de vidro uma mistura aquosa de 0,1 mL de Ácido clorídrico (HCl 18%) e 0,1 mL Ácido sulfúrico H₂SO₄ (48%), diversas concentrações de ácidos preparados previamente. Os corpos de prova foram extraídos da câmara de vácuo sob gás nitrogênio (marca Plas-Lab Quimis Q216-21), e posteriormente imersos na placa petri com a mistura de ácidos, e introduzidos imediatamente na mufla EDG Equipamentos 3000, a temperatura de 125°C $\sim$ 130°C por 6 minutos. Após o tratamento térmico, a placa petri com os corpos de prova foram extraídos da mufla e imersos rapidamente em água destilada e colocados na câmara de vácuo sob gás nitrogênio. Os corpos de prova foram extraídos da água destilada após 10 minutos e mergulhados e armazenados em cloreto de sódio 0,9 % NaCl por 6 horas, e finalmente retiradas do NaCl e expostas a secagem por 4 horas como descrito na figura 9.

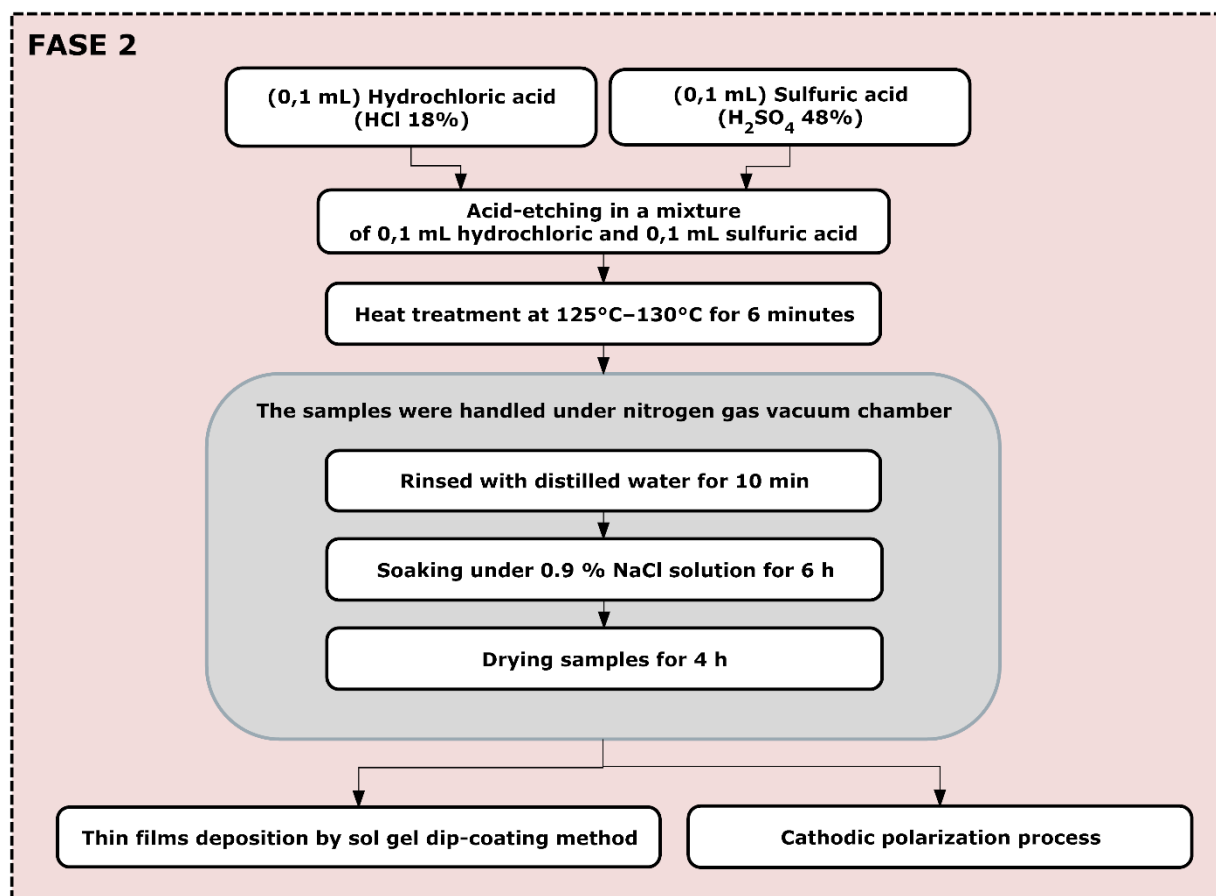


Figura 6 - Fluxograma de pré-tratamento de superfícies por ataque ácido. Fonte: O autor

As microestruturas foram observadas nas direções longitudinal (L), transversal (T) e de topo (S), e fotografadas em um microscópio óptico Olympus Modelo BX41M-LED, com câmara acoplada digital de alta resolução (10.6 megapixels digital), com programa integrado para a montagem tridimensional das micrografias. As Figuras 7, 8, e 8-B mostram as micrografias de cada uma das amostras, sem tratamento, após lixamento e tratamento ácido; e polarização catódica 0,5 horas sem tratamento, respectivamente.

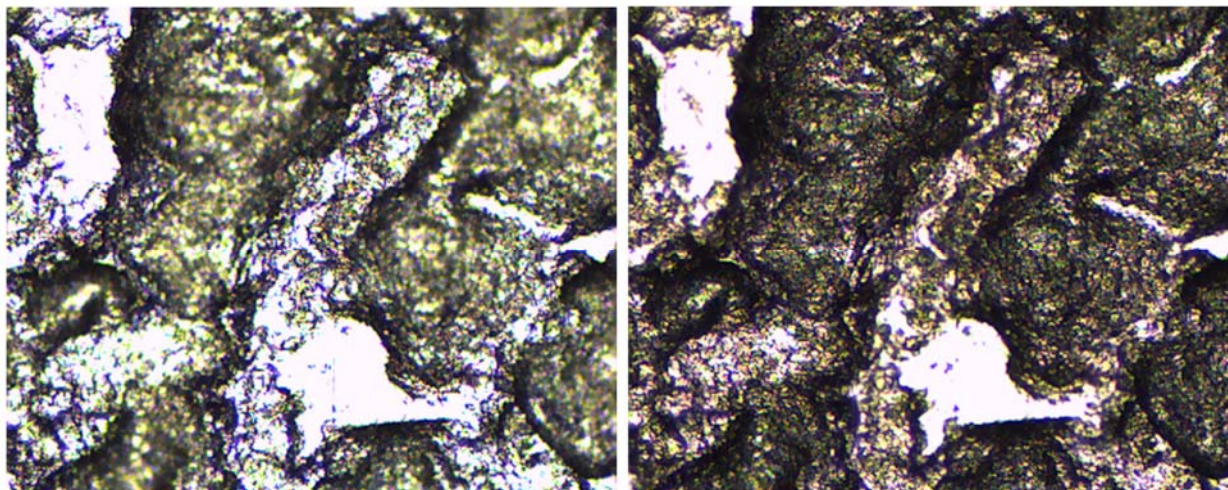


Figura 7 - Micrografia da liga titânio sem tratamento à magnificação de 1500X.
Fonte: O autor

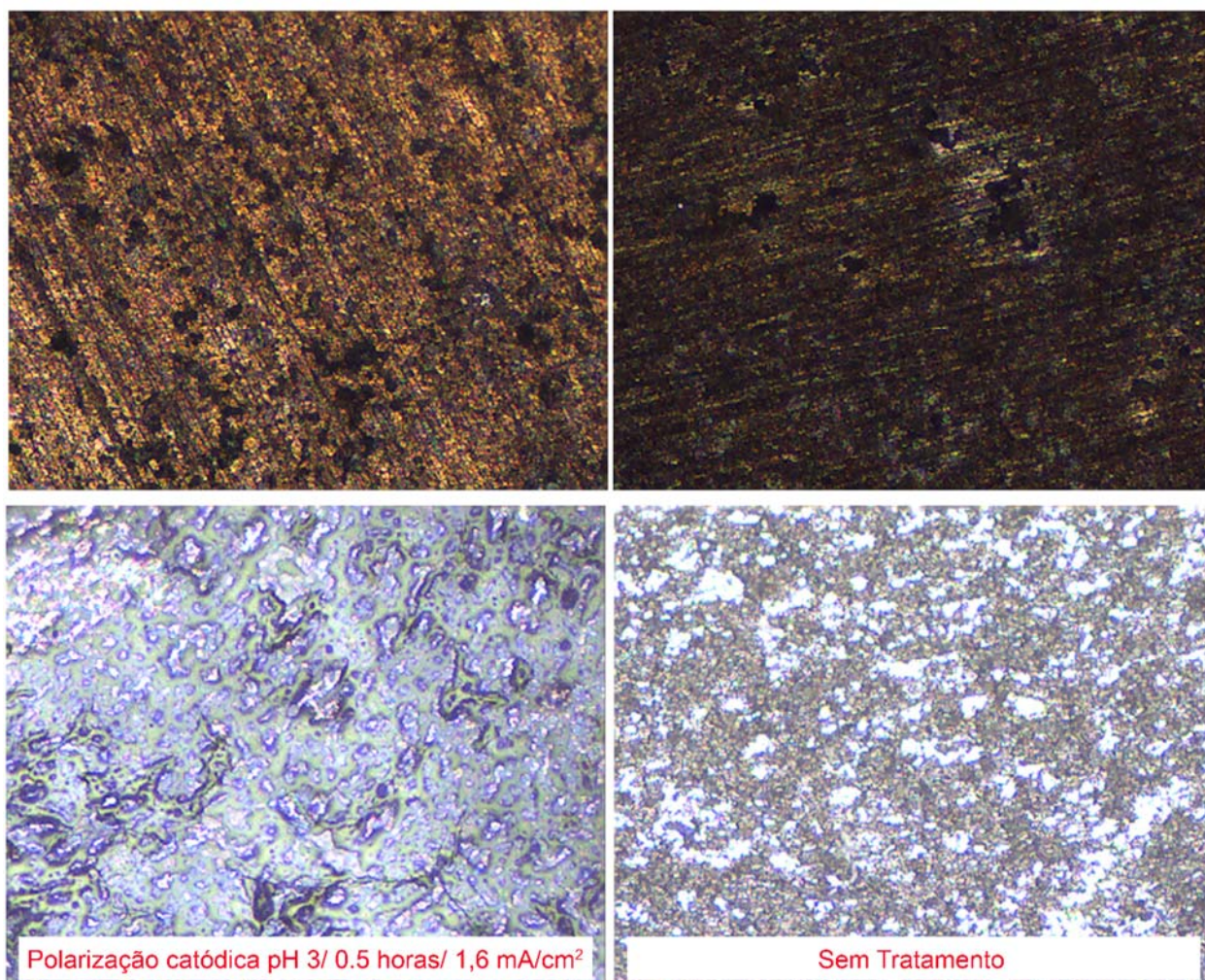


Figura 8 - Micrografia da liga titânio polimento mecânico e ataque ácido - magnificação de 1200X.
Fonte: O autor

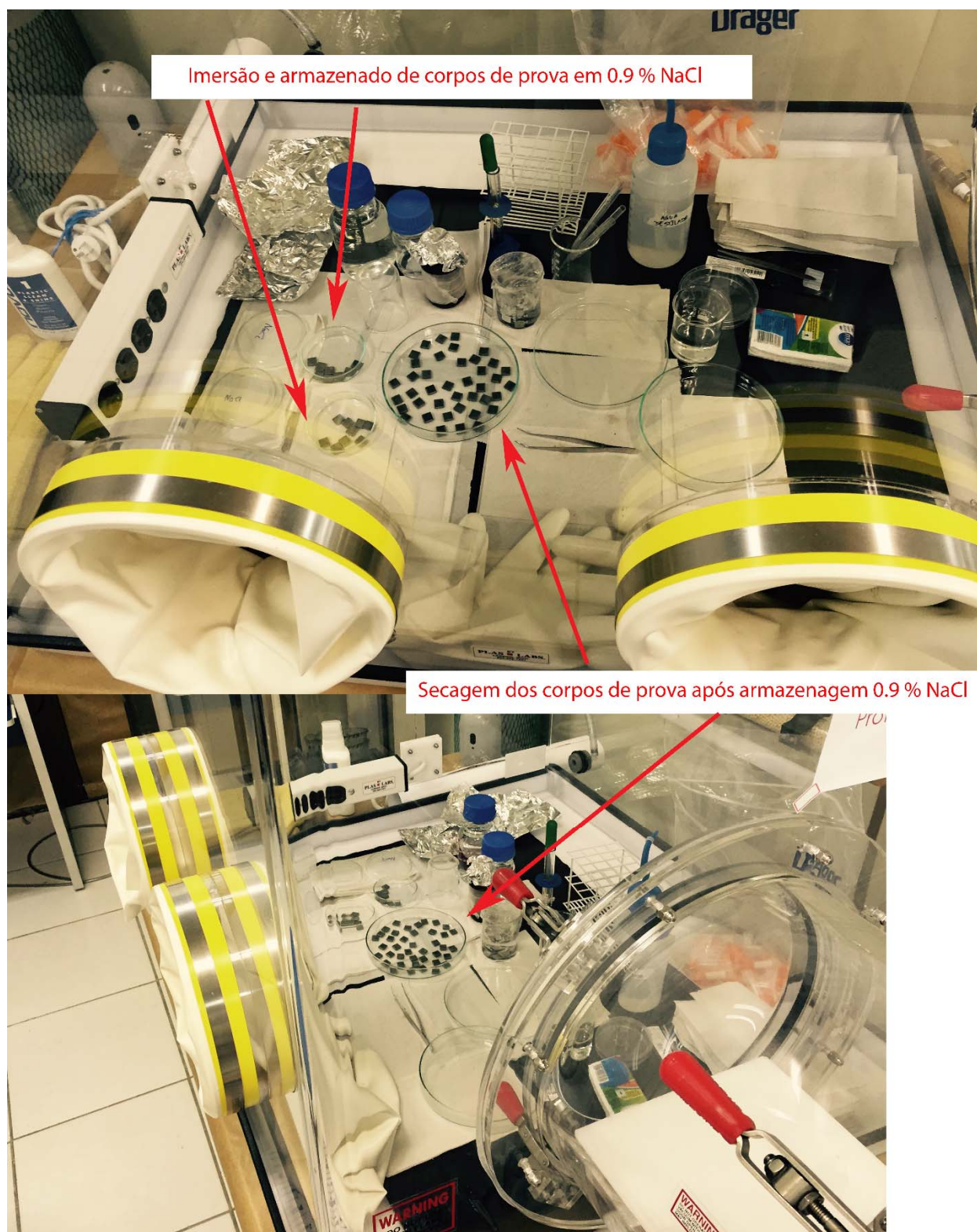


Figura 9 - Manipulação dos corpos de prova sob gás N após ataque ácido
Fonte: O autor

4.2.3 Síntese dos Sóis para a obtenção dos revestimentos biomiméticos

Na presente seção serão apresentados os métodos de síntese, preparação e deposição dos revestimentos biomiméticos nas superfícies de titânio que foram estudados.

4.2.3.1 A Síntese e o Processo Sol-Gel

A tecnologia Sol-gel sofreu uma grande transformação durante as duas últimas décadas. Novas descobertas, particularmente aqueles referentes a silicatos, desenvolvimento de blocos de nanopartículas híbridas, permitiram novas oportunidades em pesquisas biológicas abertas pelos nanocompósitos híbridos de sol-gel. Atualmente, a tecnologia sol-gel é considerada um método versátil e útil de modificação para vários campos de pesquisa (LEV; SAMPATH, 2010).

As peculiaridades do processo sol-gel (precursores organometálicos, solventes orgânicos) permitem a introdução de moléculas ou polímeros na rede inorgânica, com reações químicas a temperatura ambiente. Como os compostos orgânicos geralmente se decompõem acima de 250°C, impossibilita-se a sínteses de alguns materiais. Neste contexto, o processo sol-gel minimiza estes inconvenientes e tornam a composição química dos materiais mais bioativa (JUDEINSTEIN et al., 2010, RODRIGUES et al., 1992).

Sol é definido como partículas pequenas dispersas num meio, enquanto que o gel é uma rede relativamente rígida interligada contendo poros de tamanhos diferentes ligados por cadeias poliméricas. O gel úmido pode resultar num xerogel se os componentes voláteis forem removidos sob condições ambientais, enquanto que tornar-se-á um aerogel quando os constituintes voláteis são removidos sob condições supercríticas de um solvente. O processo sol-gel apresenta as seguintes fases hidrólise, condensação, dissolução, sol e formação de partículas, e gelificação e secagem (CATAURO; BOLLINO; PAPALE, 2014, LEV; SAMPATH, 2010). O processo sol-gel, os parâmetros associados a ele e as consequentes estruturas são especificações

importantes que são consideradas durante o processo de síntese. A formação de um gel a partir de alcóxidos pode ser pensada como formada por hidrólise de um precursor, seguido por condensação para dar polímeros e a formação de redes subsequentes ou o crescimento de pequenas partículas discretas que se ligam para dar uma rede sólida.

4.2.3.2 Fundamentos do processo de Dip-Coating

O *dip coating* ou revestimento por imersão é um processo no qual o substrato é imerso verticalmente num sol contendo o precursor, catalisador e o solvente que é retirado ou puxado com uma velocidade constante, controlada, e claramente definida, resultando em uma película onde a remoção do excesso de solvente por evaporação é retirado. O tratamento térmico subsequente produz o produto desejado (BRINKER; CLARK; ULRICH, 1986, LEV; SAMPATH, 2010). Para obtenção de um revestimento com espessura específica e uniforme, é necessário que a técnica de recobrimento seja executada com equipamentos livres de vibração e movimentos suaves no substrato (BRINKER, 2013).

Este processo de *dip coating* está dividido em 5 etapas: imersão do corpo de prova na precursor, emersão, deposição, drenagem e evaporação (BRINKER, 2013).

4.2.3.3 Materiais para a síntese dos sois e a deposição *dip coating*

A deposição do revestimento (*dip-coating*) para todos os experimentos foram executadas e padronizadas a temperatura controlada do ambiente de 15°C.

Tabela 4 - Materiais utilizados para preparação dos sóis para os revestimentos-Ti

Reagentes	Formula molecular	Marca
Água destilada	H ₂ O	Laboratório
Propóxido de zircônio (IV)	Zr(OCH ₂ CH ₂ CH ₃) ₄	Sigma aldrich
Isopropóxido de titânio (IV)	Ti[OCH(CH ₃) ₂] ₄	Sigma aldrich
ETOH - Álcool etílico	CH ₃ CH ₂ OH	Sigma aldrich
Acac - Acetilacetona	CH ₃ COCH ₂ COCH ₃	Sigma aldrich
PEG - Polietileno glicol (BioUltra)400	H(OCH ₂ CH ₂) _n OH	Sigma aldrich
Hidróxido de lítio monohidratado	LiOH.H ₂ O	Vetec
Nitrato de indium Hidrato III 99.99%	In(NO ₃) ₃ · xH ₂ O	Sigma aldrich
Cloreto de estanho (IV) anidro	SnCl ₄	Sigma aldrich
Etilenoglicol	HOCH ₂ CH ₂ OH	Sigma aldrich
Hidróxido de estrôncio 94%	Sr(OH) ₂	Sigma aldrich

4.2.3.3.1 Síntese do Sol de ZrO₂/PEG e *dip coating*

A figura 10 ilustra o fluxograma do processo de síntese e revestimento do sol híbrido de ZrO₂/PEG [0,2 Molar]. A forma de solubilização utilizada durante todo o processo de síntese foi através de agitação magnética e pelo controle da velocidade, que foi ajustada à velocidade de agitação de 4 rpm e com temperatura de 45°C. O processo iniciou através da solubilização de propóxido de zircônio (IV) (2,5 mL) em álcool etílico (ETOH) (10 mL) e Acetilacetona (Acac) (3,7 mL) por 5 minutos. Como resultado obteve-se uma solução branca e leitosa (figura 11-A). Em seguida foi agregada à mistura, água destilada de forma contínua e lenta na proporção de 20 mL e deixar sob agitação por mais 5 minutos, após foi acrescentada à solução a mistura de 10 mL de álcool etílico (ETOH) e polietileno glicol (PEG) previamente preparado nas proporções de 10 mL ETOH + 2mL PEG por 5 minutos adicionais. Como resultado, obteve-se uma solução amarela e transparente (Figura 11-B).

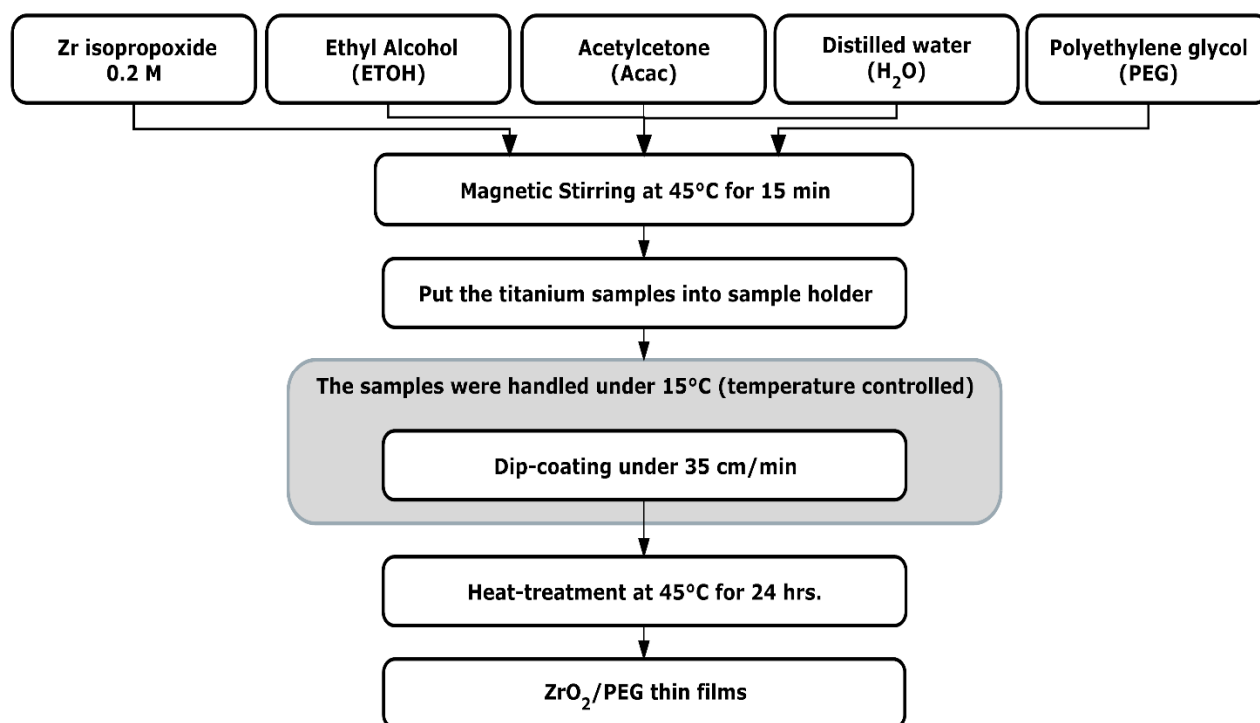


Figura 10 - Fluxograma da síntese do sol-gel de ZrO_2/PEG e dip coating
Fonte: O autor



Figura 11 - Processo de preparação de sol de ZrO_2/PEG
Fonte: O autor

Como ilustra o fluxograma da Figura 11, o processo de revestimento para o sol ZrO_2 /PEG [0,2 Molar], nos corpos de prova de titânio TI F67 GR2 com dimensão $1 \times 1 \text{ cm}^2$ e 2,25 mm de espessura, os que foram previamente pré-tratadas como descrito (Fase 1) figura 4 e (fase 2) figura 6, os revestimentos foram fabricados usando a técnica de *dip-coating*, onde estes corpos de prova de titânio foram usados como substrato, utilizando o equipamento por imersão (*dip-coating*) da marca Marconi modelo MA765, com um sistema de elevação para emulsificação das placas. Os corpos de prova de titânio foram colocados na porta amostras com capacidade para 3 corpos de prova. Cada porta amostras foi dotada de um pino para facilitar a conexão com a abraçadeira do equipamento por imersão. Subsequentemente, os substratos foram revestidos com as soluções híbridas ZrO_2 /PEG [0,2 Molar]. A velocidade de extração foi ajustada para 35 cm/min. Os substratos revestidos foram gelificados e secos no ar a temperatura ambiente dentro do equipamento do *dip-coating* por 1 minuto. Os substratos revestidos foram submetidos a tratamento térmico (Mufla: EDG Equipamentos 3000) a 45°C durante 24 horas para promover a densificação do filme. Após tratamento térmico, os substratos revestidos foram armazenados na câmara de vácuo sob gás nitrogênio (marca Plas-Lab Quimis Q216-21) por 8 horas até serem embalados e encaminhados para as diversas caracterizações como ilustrado na figura 12.

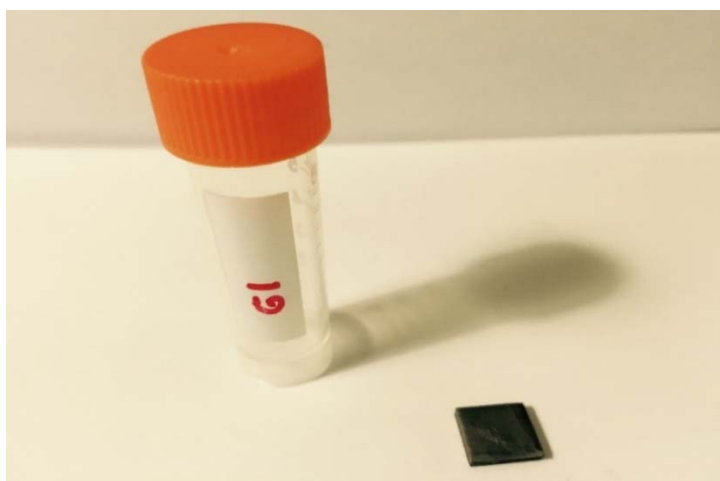


Figura 12 - Corpos de prova de TI F67 GR2 substratos revestidos ZrO_2 /PEG
Fonte: O autor

4.2.3.3.2 Síntese do sol TiO_2 /PEG e dip coating

A figura 13 ilustra o fluxograma do processo de síntese e revestimento, do sol híbrido de TiO_2 /PEG [0,2 Molar]. O modo de solubilização utilizado durante todo o processo de síntese foi através de agitação magnética e controle de velocidade, que foi ajustada a uma velocidade de agitação de 4 rpm e a temperatura de 50°C , e que iniciou através da solubilização de Isopropóxido de Titânio (IV) (2,4 mL) em álcool etílico (ETOH) (10 mL) e Acetilacetona (Acac) (3,7 mL) por 10 minutos. Em seguida foi agregada à mistura água destilada de forma contínua e lenta na proporção de 20 mL e deixado sob agitação por 5 minutos. Após foi acrescentada à solução a mistura de álcool etílico (ETOH) 10 mL e polietileno glicol (PEG) previamente preparada, nas proporções de 10 mL ETOH + 2mL PEG por 10 minutos adicionais. Como resultado foi obtida uma solução translúcida de cor amarela (figura 17).

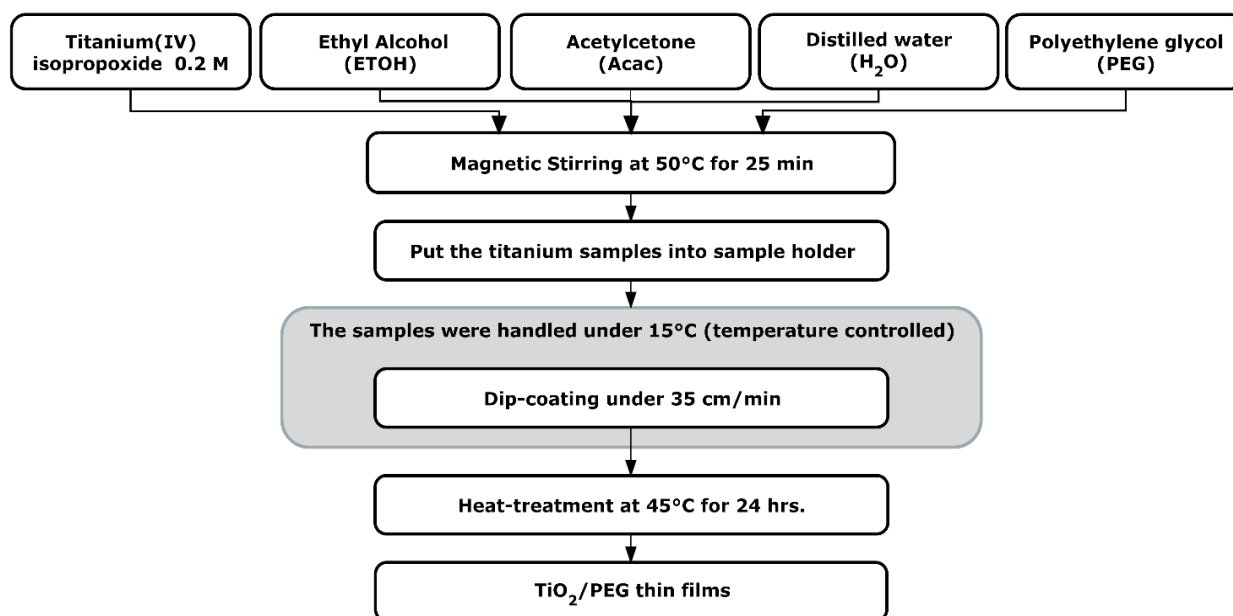


Figura 13 - Fluxograma da síntese do sol-gel de TiO_2 /PEG e dip coating
Fonte: O autor

O fluxograma da Figura 13 ilustra o processo de revestimento para o sol TiO_2 /PEG [0,2 Molar], nos corpos de prova de titânio TI F67 GR2 com dimensão $1 \times 1 \text{ cm}^2$ e

2,25 mm de espessura, pré-tratados como descrito previamente (Fase 1 da Figura 4 e fase 2 da Figura 6). Os revestimentos foram fabricados usando a técnica de dip-coating, onde os corpos de prova de titânio foram usados como substrato, utilizando o equipamento por imersão (dip-coating) da marca Marconi modelo MA765, com um sistema de elevação para emulsificação das placas. Os corpos de prova de titânio foram colocados no porta amostras com capacidade para 3 corpos de prova. Os porta amostras foram dotados de um pino para facilitar a conexão com a braçadeira do equipamento por imersão. Subsequentemente, os substratos foram revestidos com as soluções híbridas TiO_2/PEG [0,2 Molar]. A velocidade de extração foi ajustada para 35 cm/min. Os substratos revestidos foram gelificados e secos no ar a temperatura ambiente dentro do equipamento do dip-coating por 1 minuto. Após os substratos revestidos foram submetidos a tratamento térmico (Mufla: EDG Equipamentos 3000) à temperatura de 50°C durante 24 horas para promover a densificação do filme. Após tratamento térmico os substratos revestidos foram armazenados na câmara de vácuo sob gás nitrogênio (marca Plas-Lab Quimis Q216-21) por 8 horas até serem embalados e encaminhados para as diversas caracterizações.

4.2.3.3.3 Síntese do Sol de TiO_2 : Li^+ (15%): Zr (15%)/PEG e dip coating

A figura 14 ilustra o fluxograma do processo de síntese e revestimento, do sol híbrido de TiO_2 [2 M]: Li (15%): Zr (15%)/PEG. O modo de solubilização utilizado durante todo o processo de síntese foi através de agitação magnética e pelo controle de velocidade, que foi ajustada à velocidade de agitação de 4 rpm e a temperatura de 50°C. Iniciou-se o processo através da solubilização de Isopropóxido de Titânio (IV) (2,4 mL) em álcool etílico (ETOH) (10 mL) e Acetilacetona (Acac) (3,7 mL) por 10 minutos. Em seguida foi agregada à mistura os dopantes na proporção de 15%, primeiro o propóxido de zircônio (IV) na proporção de 0,38 mL sob agitação magnética por mais 10 minutos, imediatamente depois, o segundo dopante foi acrescentado à mistura previamente preparada de 20 mL de H_2O e 0,05 g de Li^+ (Hidróxido de lítio monohidratado), sob agitação magnética por mais 5 minutos, e finalmente foi acrescentado à solução de álcool etílico (ETOH) 10 mL e polietileno glicol (PEG) previamente preparado nas proporções

de 10 mL ETOH + 2mL PEG por 10 minutos. Como resultado, obteve-se uma solução translúcida de cor marrom claro (Figura 17).

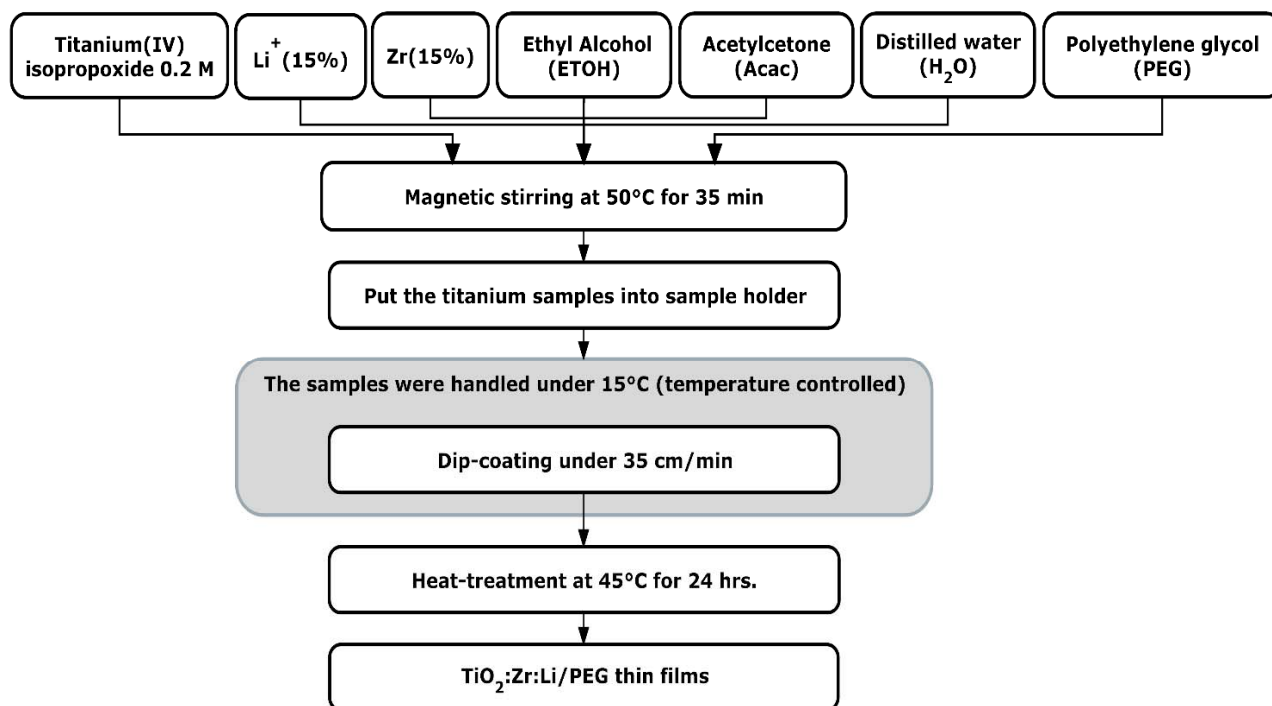


Figura 14 - Fluxograma da síntese do sol-gel de $\text{TiO}_2\text{:Li}^+(15\%)\text{:Zr}(15\%)/\text{PEG}$
Fonte: O autor

O fluxograma da Figura 14 ilustra o processo de revestimento para o sol TiO_2 [2 M]: $\text{Li}^+(15\%)\text{:Zr}(15\%)/\text{PEG}$, nos corpos de prova de titânio TI F67 GR2 com dimensão $1 \times 1 \text{ cm}^2$ e 2,25 mm de espessura, previamente tratados como descrito na figura 4 e figura 6. Os revestimentos foram fabricados usando a técnica de dip-coating, onde estes corpos de prova de titânio foram usados como substrato, utilizando o equipamento por imersão (dip-coating) da marca Marconi modelo MA765, com um sistema de elevação para emulsificação as placas. Os corpos de prova de titânio foram colocados no porta amostras com capacidade para 3 corpos de prova. O porta amostras foi dotado de um pino para facilitar a conexão com a abraçadeira do equipamento por imersão. Subsequentemente, os substratos foram revestidos com as soluções híbridas TiO_2 [2 M]: $\text{Li}^+(15\%)\text{:Zr}(15\%)/\text{PEG}$. A velocidade de extração foi ajustada para 35 cm/min. Os substratos revestidos foram gelificados e secos no ar a temperatura ambiente dentro do equipamento do dip-coating por 1 minutos. Após, os substratos revestidos foram

submetidos a tratamento térmico (Mufla: EDG Equipamentos 3000) à temperatura de 45°C durante 24 horas para promover a densificação do filme. Após tratamento térmico, os substratos revestidos foram armazenados na câmara de vácuo sob gás nitrogênio (marca Plas-Lab Quimis Q216-21) por 8 horas até serem embalados e encaminhados para as diversas caracterizações.

4.2.3.3.4 Síntese de Sol de TiO₂: Li⁺ (15%)/PEG e dip coating

A figura 15 ilustra o fluxograma do processo de síntese e revestimento, do sol híbrido de TiO₂ [2 M]: Li (15%)/PEG. O modo de solubilização utilizado durante todo o processo de síntese foi através de agitação magnética e pelo controle de velocidade, que foi ajustada à velocidade de agitação de 4 rpm e com temperatura de 50°C. Iniciou-se o processo através da solubilização de Isopropóxido de Titânio (IV) (2,4 mL) em álcool etílico (ETOH) (10 mL) e Acetilacetona (Acac) (3,7 mL) por 10 minutos. Em seguida foi agregada à solução o dopante 15% previamente preparada de (20 mL) de H₂O e 0,05 g de Li⁺ (Hidróxido de lítio monohidratado), sob agitação magnética por mais 5 minutos, e finalmente foi acrescentado a mistura de álcool etílico (ETOH) 10 mL e polietileno glicol (PEG) previamente preparada nas proporções de 10 mL ETOH + 2mL PEG por mais 10 minutos. Como resultado, obteve-se uma solução translúcida de cor marrom claro (Figura 17-C).

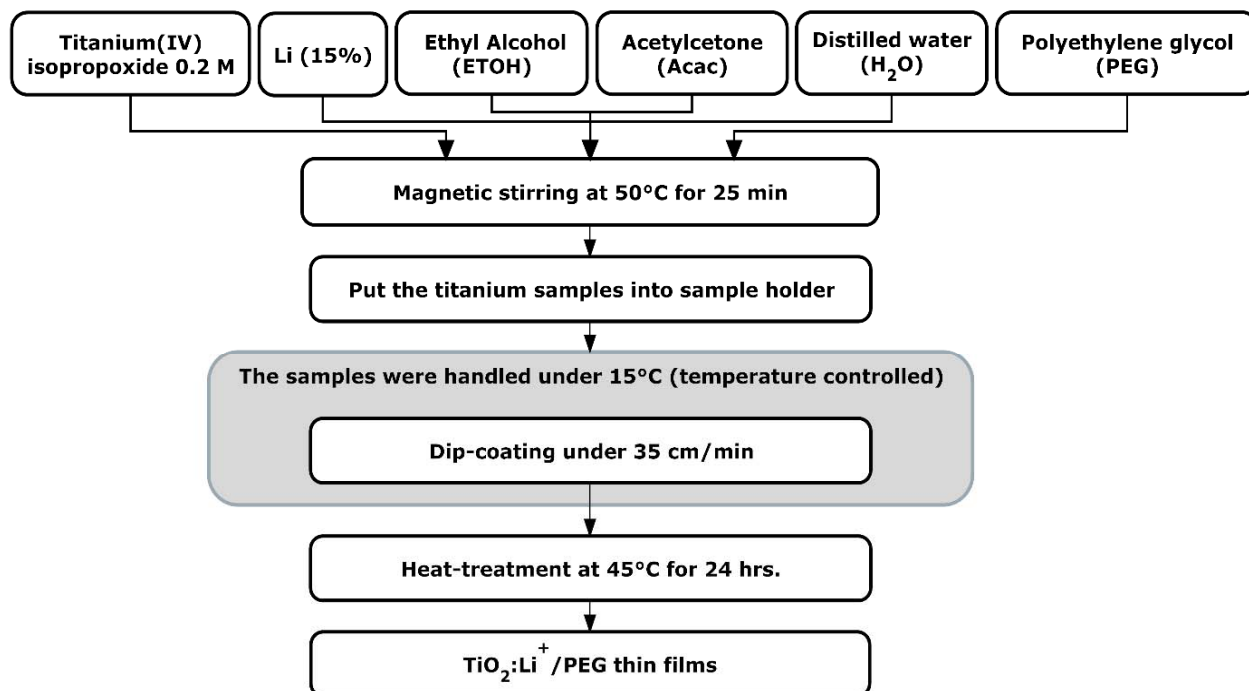


Figura 15 - Fluxograma da síntese do sol-gel de $\text{TiO}_2:\text{Li}^+ (15\%)/\text{PEG}$ e dip coating
Fonte: O autor

O fluxograma da Figura 15 ilustra o processo de revestimento para o sol TiO_2 [2 M]: Li (15%)/PEG, nos corpos de prova de titânio TI F67 GR2 com dimensão $1 \times 1\text{ cm}^2$ e 2,25 mm de espessura, pré-tratadas como descrito figura 4 e figura 6. Os revestimentos foram fabricados usando a técnica de dip-coating, onde os corpos de prova de titânio foram usados como substrato, utilizando o equipamento por imersão (dip-coating) da marca Marconi modelo MA765, com um sistema de elevação para emulsificação das placas. Os corpos de prova de titânio foram colocados no porta amostras com capacidade para 3 corpos de prova. O porta amostras foi dotada de um pino para facilitar a conexão com a braçadeira do equipamento por imersão. Subsequentemente, os substratos foram revestidos com as soluções híbridas TiO_2 [2 M]: Li (15%)/PEG. A velocidade de extração foi ajustada para 35 cm/min . Os substratos revestidos foram gelificados e secos no ar a temperatura ambiente dentro do equipamento do dip-coating por 1 minuto. Após, os substratos revestidos foram submetidos a tratamento térmico (Mufla: EDG Equipamentos 3000) à temperatura de 50°C durante 24 horas para promover a densificação do filme. Após tratamento térmico os substratos revestidos foram armazenados na câmara de vácuo sob gás nitrogênio (marca Plas-Lab Quimis

Q216-21) por 8 horas até serem embalados e encaminhados para as diversas caracterizações.

4.2.3.3.5. Síntese de Sol de ITO e dip coating

A figura 16 ilustra o fluxograma do processo de síntese e revestimento do sol de ITO. O modo de solubilização utilizado durante todo o processo de síntese foi através de agitação magnética e pelo controle de velocidade de agitação que foi ajustada a 10 rpm, e com temperatura de $\sim 15^{\circ}\text{C}$. O processo iniciou através da solubilização de Nitrato de índio (III) hidratado 99.99% (2,42 gr) e cloreto de estanho (IV) anidro (4 μL) em álcool etílico (ETOH) por 24 horas. Após 24 horas, em seguida foi agregada à solução Etileno glicol (0,84 mL), após 1 minuto foi agregada à solução Acetilacetona (Acac) (0,03 mL) por 1 minuto. Depois desse processo, foi reajustada a velocidade de agitação para 8 rpm por 30 minutos adicionais. Como resultado, obteve-se uma solução translúcida clara como observado na figura 17-D.

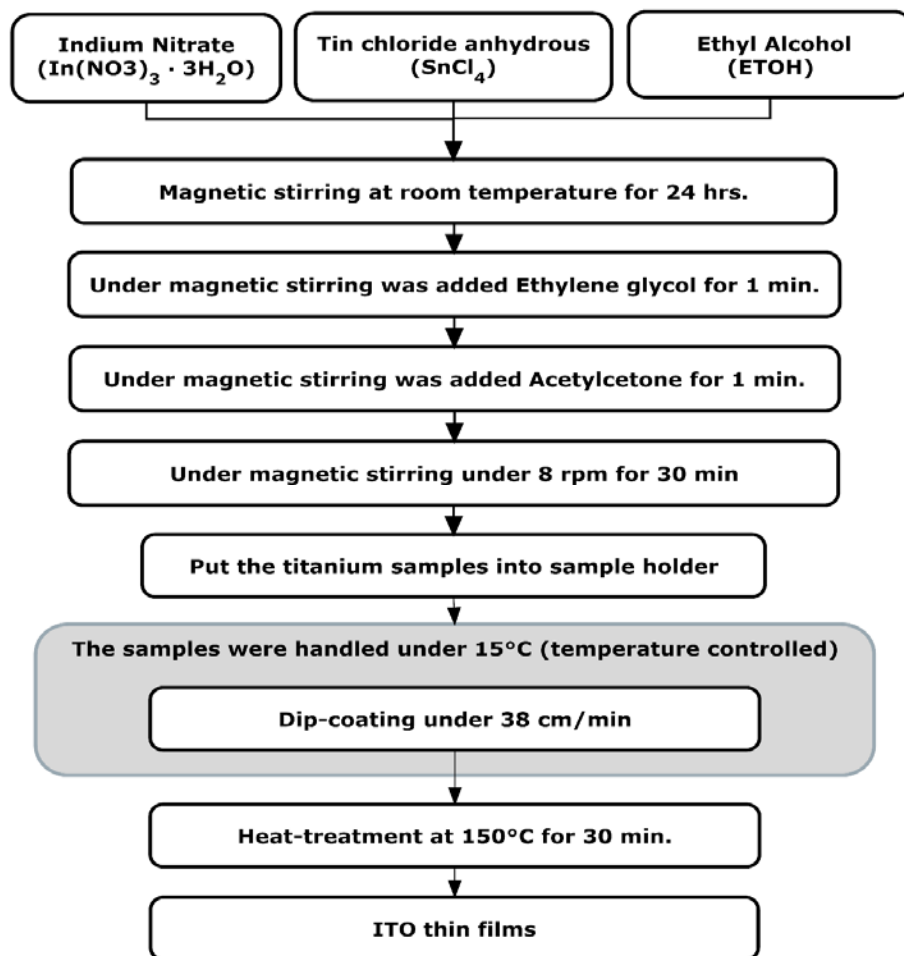


Figura 16 - Fluxograma da síntese de sol-gel de ITO e dip coating
Fonte: O autor

No fluxograma da Figura 16 ilustra-se o processo de revestimento para o sol ITO, nos corpos de prova de titânio TI F67 GR2 com dimensão 1x1 cm² e 2,25 mm de espessura, previamente tratadas como descrito figura 4 e figura 6. Os revestimentos foram fabricados usando a técnica de dip-coating, onde estes corpos de prova de titânio foram usados como substrato, utilizando o equipamento por imersão (dip-coating) da marca Marconi modelo MA765. Os corpos de prova de titânio foram colocados no porta amostras com capacidade para 3 corpos de prova. O porta amostras foi dotado de um pino para facilitar a conexão com a abraçadeira do equipamento por imersão. Subsequentemente, os substratos foram revestidos com o sol de ITO. A velocidade de extração foi ajustada para 38 cm/min (G5) e 20 cm/min (G6), respectivamente. Os substratos revestidos foram gelificados e secos no ar a temperatura ambiente dentro do

equipamento do dip-coating por 2 minutos. Os substratos revestidos foram submetidos a tratamento térmico (Mufla: EDG Equipamentos 3000) à temperatura de 150°C durante 30 minutos. Após tratamento térmico, os substratos revestidos foram armazenados na câmara de vácuo sob gás nitrogênio (marca Plas-Lab Quimis Q216-21) por 4 horas até serem embalados e encaminhados para as diversas caracterizações.

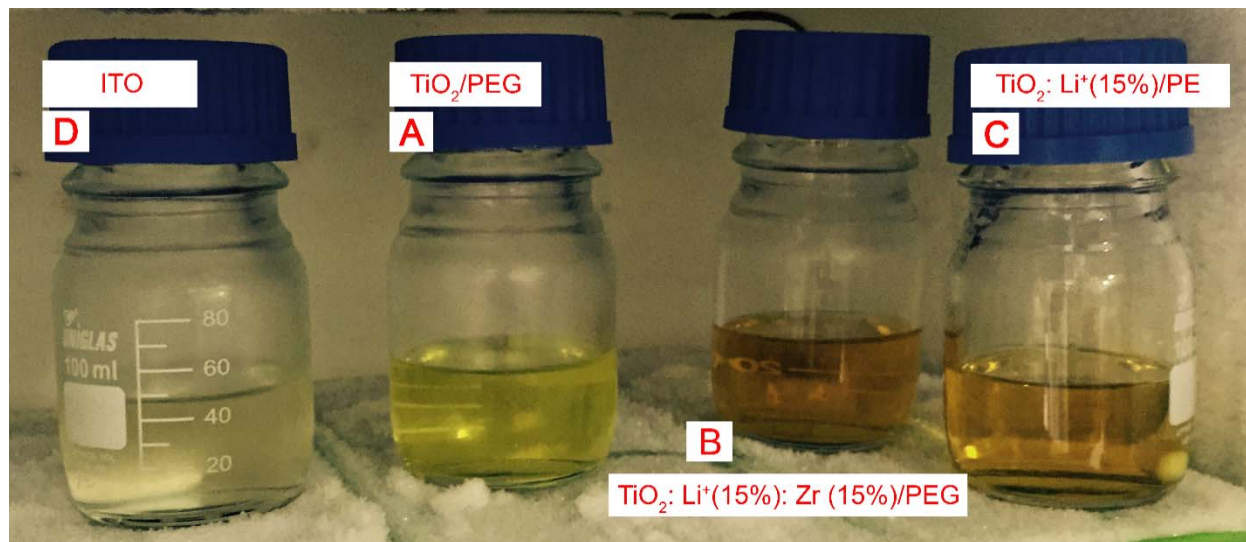


Figura 17 - Sóis para preparação dos revestimentos biomiméticos
Fonte: O autor

4.2.3.3.6. Síntese de Sol de ZrO₂ [2 M]: Li⁺ (15%)/PEG e dip coating

A figura 18 ilustra o fluxograma do processo de síntese e revestimento, do sol híbrido de ZrO₂/PEG [0,2 Molar]. O modo de solubilização utilizado durante todo o processo de síntese foi através de agitação magnética, e pelo controle da velocidade agitação que foi ajustada a 4 rpm e com temperatura entre ~40-45°C. Iniciou-se o processo através da solubilização de Isopropóxido de Zircônio (IV) (2,4 mL) em álcool etílico (ETOH) (10 mL) e Acetilacetona (Acac) (3,7 mL) por 5 minutos. Em seguida foi agregada à solução o dopante 15% previamente preparada de (20 mL) de H₂O e (0,05 g) L⁺ (Hidróxido de lítio monohidratado), sob agitação magnética por mais 10 minutos, e finalmente foi acrescentado à mistura de álcool etílico (ETOH) e polietileno glicol (PEG)

previamente preparado nas proporções de 10 mL ETOH + 2mL PEG por mais 10 minutos.

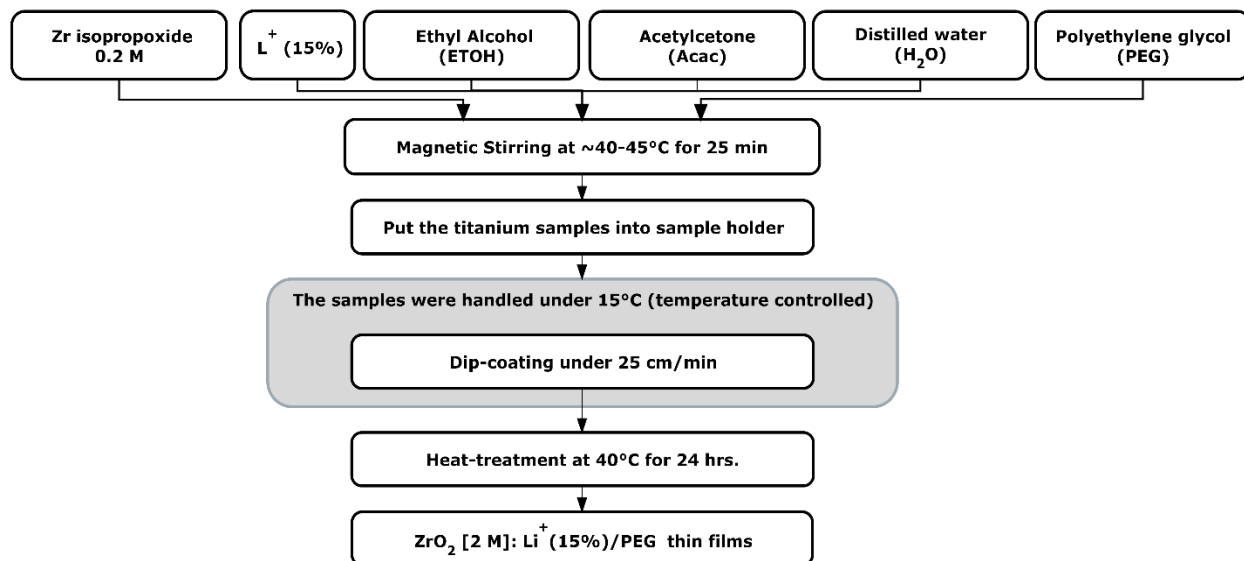


Figura 18 Fluxograma da síntese de sol-gel de ZrO₂ [2 M]: Li⁺ (15%)/PEG e dip coating
Fonte: O autor

O fluxograma da Figura 18 ilustra o processo de revestimento para o sol ZrO₂ [2 M]: Li⁺ (15%)/PEG, nos corpos de prova de titânio TI F67 GR2 com dimensão 1x1 cm² e 2,25 mm de espessura, que foram pré-tratadas como descrito (Fase 1) figura 4 (fase 2) e figura 6. Os revestimentos foram fabricados usando a técnica de *dip-coating*, onde estes corpos de prova de titânio foram usados como substrato, utilizando o equipamento por imersão (*dip-coating*) da marca Marconi modelo MA765, com um sistema de elevação para emulsificação as placas. Os corpos de prova de titânio foram colocados no porta amostras com capacidade para 3 corpos de prova. O porta amostras foi dotado de um pino para facilitar a conexão com a abraçadeira do equipamento por imersão. Subsequentemente, os substratos foram revestidos com as soluções híbridas ZrO₂ [2 M]: Li⁺ (15%)/PEG. A velocidade de extração foi ajustada para 25 cm/min. Os substratos revestidos foram gelificados e secos no ar a temperatura ambiente dentro do equipamento *dip-coating* por 1 minutos. Após, os substratos revestidos foram submetidos a tratamento térmico (Mufla: EDG Equipamentos 3000) a 40°C durante 24 horas para

promover a densificação do filme. Após tratamento térmico, os substratos revestidos foram armazenados na câmara de vácuo sob gás nitrogênio (marca Plas-Lab Quimis Q216-21) por 8 horas até serem embalados e encaminhados para as diversas caracterizações.

4.2.3.3.7. Síntese de Sol de ZrO_2 [2 M]: Li^+ (15%): Sr (15%)/PEG e dip coating

A figura 19 ilustra o fluxograma do processo de síntese e revestimento, do sol híbrido de ZrO_2 [2 M]: Li^+ (15%): Sr (15%)/PEG. O modo de solubilização utilizado durante todo o processo de síntese foi através de agitação magnética, e pelo controle de velocidade de agitação que foi ajustada a 4 rpm e com temperatura de $\sim 40\text{-}45^\circ\text{C}$, iniciou-se o processo através da solubilização de Isopropóxido de Zircônia (IV) (2,5 mL) em álcool etílico (ETOH) (10 mL) e Acetilacetona (Acac) (3,7 mL) por 5 minutos. Em seguida foi agregada à solução os dopantes nas proporções de Li^+ (15%) e Sr (15%) respectivamente, primeiro, foi acrescentada, a mistura previamente preparada de H_2O (10 mL) e Li^+ (Hidróxido de lítio monohidratado) (0,05 g), após 10 minutos foi acrescentada à solução 10 mL de H_2O e Hidróxido de estrôncio (Sr) (0,05 g) sob agitação magnética por 10 minutos, e finalmente foi acrescentado à solução 10 mL álcool etílico (ETOH) e 2mL de polietileno glicol (PEG) previamente preparado por 10 minutos.

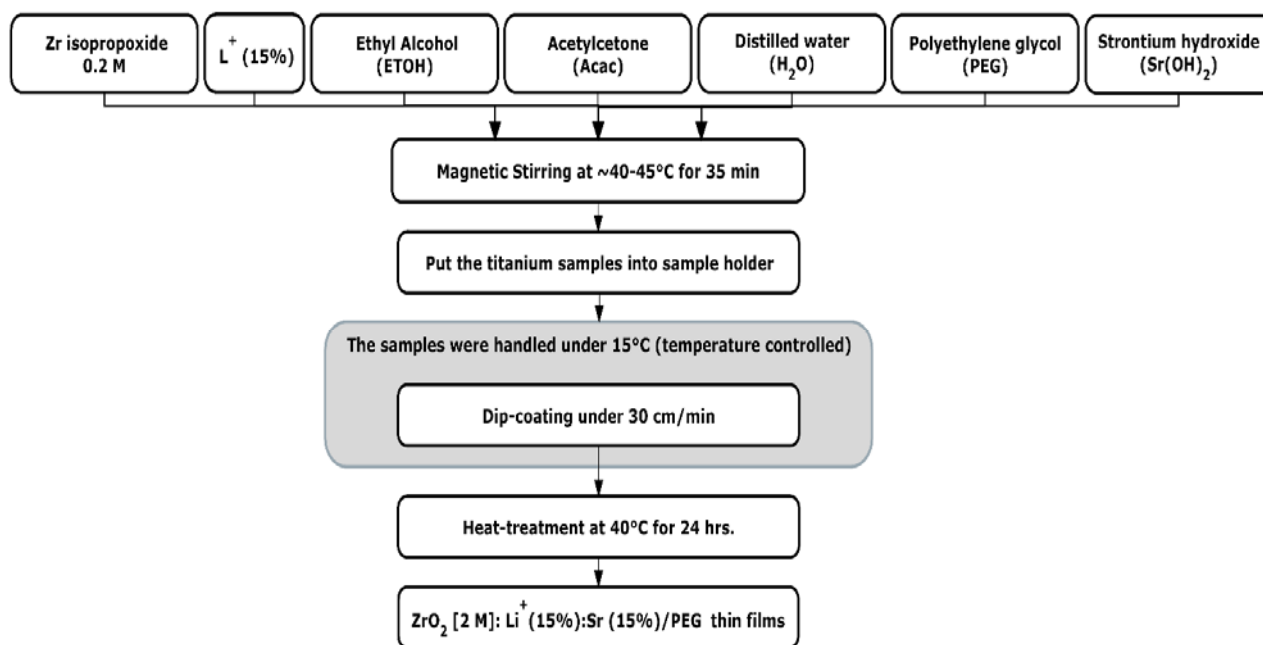


Figura 19 - Fluxograma da síntese de sol-gel de ZrO₂ [2 M]: Li⁺ (15%): Sr (15%)/PEG e dip coating
Fonte: O autor

O fluxograma da Figura 19 ilustra o processo de revestimento para o sol ZrO₂ [2 M]: Li⁺ (15%): Sr (15%)/PEG, nos corpos de prova de titânio TI F67 GR2 com dimensão 1x1 cm² e 2,25 mm de espessura, os que foram previamente tratadas como descrito na figura 4 (Fase 1) e na figura 6 (fase 2). Os revestimentos foram fabricados usando a técnica de *dip-coating*, onde estes corpos de prova de titânio foram usados como substrato, utilizando o equipamento por imersão (*dip-coating*) da marca Marconi modelo MA765, com um sistema de elevação para emulsificação as placas. Os corpos de prova de titânio foram colocados no porta amostras com capacidade para 3 corpos de prova. O porta amostras foi dotado de um pino para facilitar a conexão com a abraçadeira do equipamento por imersão. Subsequentemente, os substratos foram revestidos com as soluções híbridas ZrO₂ [2 M]: Li⁺ (15%): Sr (15%)/PEG. A velocidade de extração foi ajustada para 35 cm/min. Os substratos revestidos foram gelificados e secos no ar a temperatura ambiente dentro do equipamento *dip-coating* por 1 minuto. Após, os substratos revestidos foram submetidos a tratamento térmico (Mufla: EDG Equipamentos 3000) a 40°C durante 24 horas para promover a densificação do filme. Após tratamento térmico, os substratos revestidos foram armazenados na câmara de vácuo sob gás

nitrogênio (marca Plas-Lab Quimis Q216-21) por 8 horas até ser embalados e encaminhados para as diversas caracterizações.

4.2.4. Técnicas eletroquímicas

Diversos métodos eletroquímicos podem ser utilizados para se obter películas de óxidos sobre a superfície dos biomateriais principalmente em diversas ligas de titânio. O presente estudo visou o estudo do comportamento do Ti F67 GR2 #2,25 MM, utilizando a técnica de polarização catódica. Estas técnicas são utilizadas para estudos de corrosão e biocorrosão de materiais mecânicos para biomateriais (LEWANDOWSKI; BEYENAL, 2013).

4.2.4.1. Polarização Catódica

As reações catódicas envolvem a redução de oxigênio e a liberação de hidrogênio e podem ocorrer em meio ácido ou em meio básico (PHILIP A. SCHWEITZER, 2009). Na reação catódica em meio ácido, o hidrogênio pode estar acessível na superfície do metal de várias fontes, incluindo a redução catódica do hidrogênio da água (SINGH; DAHOTRE, 2007).



Estas reações catódicas podem ocorrer por corrosão, proteção catódica, decapagem ácida, ou outro processo de limpeza. O hidrogênio penetra na rede como hidrogênio nascente, ou atômico, que é uma forma intermediária na formação da molécula de H_2 na superfície pelas equações 1 ou 2. Processos que envolvem polarização catódica aceleram a formação de hidrogênio. Alguns elementos, quando dissolvidos na liga, retardam a formação do H_2 aumentando o tempo de residência do hidrogênio nascente na superfície (MCCAFFERTY, 2010, SZABO et al., 2001). Desta forma há o favorecimento da difusão do hidrogênio para o interior da liga causando danos

por hidrogênio. Os elementos mais comuns que retardam a saída do hidrogênio são P, Sb, As, S, Se, Te e CN. O mais comum é o enxofre, por estar presente em fluidos como o petróleo, gás natural, águas de poços e vapores geotérmicos (LEWANDOWSKI; BEYENAL, 2013). Na polarização catódica de corrente contínua ou impressa a configuração usada consiste numa fonte em um equipamento eletroquímico ligado ao cátodo da amostra e um ânodo de platina, sob meio ácido (Fórmulas 1 e 2).

4.2.4.2. Parte experimental polarização catódica

Esta seção visa a descrição do procedimento experimental de polarização catódica realizada no ambiente do presente trabalho para uma melhor compreensão dos resultados experimentais. Os materiais utilizados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Materiais utilizados para do processo de polarização catódica

Reagentes	Fórmula molecular	Marca
Ácido acético	CH_3COOH	Sigma aldrich
Acetato de sódio	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	Sigma aldrich
Papel indicador de pH (0-14)	-	MColorpHast
Água Destilada	H_2O	Laboratório

4.2.4.3. Ensaio eletroquímico polarização catódica

No ensaio eletroquímico (Polarização catódica) utilizou-se uma célula de vidro de três elétrodos com dupla parede (Figura 20).

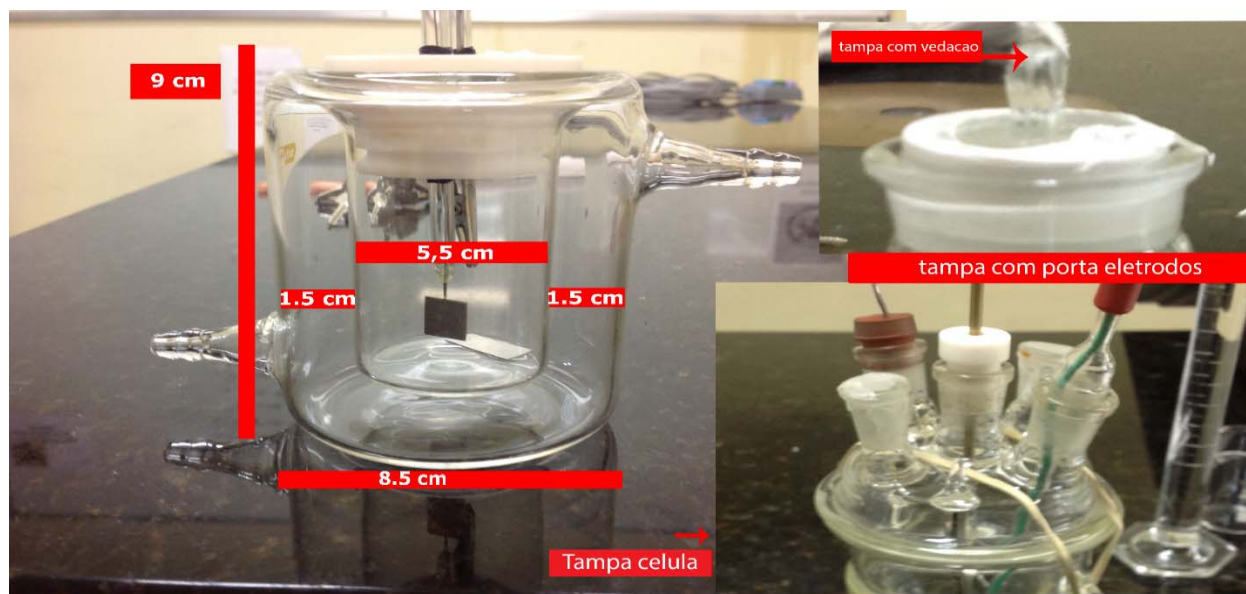


Figura 20 - Características da célula Eletroquímica para 5 eléctrodos
Fonte: O autor

O eléctrodo cátodo utilizado nos ensaios realizados foi um corpo de prova de liga de titânio TI F67 GR2 - UNS R50400, com dimensão de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ e 2,25 mm de espessura.

De modo a remover a rugosidade do produto original e substâncias pudessem ser adsorvidas na superfície do eléctrodo, houve a necessidade de realizar um pré-tratamento nos corpos de prova como descrito nos fluxogramas da figura 4 e figura 6 respectivamente, que são os pré-tratamentos sob procedimentos de polimento mecânico e pré-tratamento por ataque ácido.

Como ilustra o fluxograma da figura 21 e a esquematização da figura 23, os corpos de prova foram montados e inseridos no porta amostras de costas do lado sem pré-tratamento e lado com pré-tratamento mecânico e ataque ácido, foram colocados em frente da platina retangular cobrindo toda a superfície dos corpos de prova numa distância de 1,5 cm, sob um agitador magnético a 5 rpm e com uma temperatura de 21°C . O eléctrodo de platina apresentou forma retangular-semicircular e as amostras foram sempre colocadas no centro do eletrodo de platina para assegurar uma distância horizontal 1,5 cm e vertical igual entre os dois eletrodos para todos os corpos de prova.

O pH 3 foi monitorado a cada 30 minutos com papel indicador de pH (0-14) MColorpHast. A temperatura foi controlada com um termômetro de lado da célula eletroquímica com um Becker e água. A tabela 6 descreve as polarizações que foram realizadas em 200 ml de uma solução tampão 2 M de ácido acético e acetato de sódio a pH 3 e pH 5. No *setup* as amostras de titânio são o catodo e durante a redução catódica. A solução tampão foi mantida a 21°C durante todo o ensaio experimental. Após o processo todas as amostras foram secas numa câmara de vácuo sob gás nitrogênio (marca Plas-Lab Quimis Q216-21) por 2 horas até ser embaladas em tubos eppendorf para as diversas caracterizações.

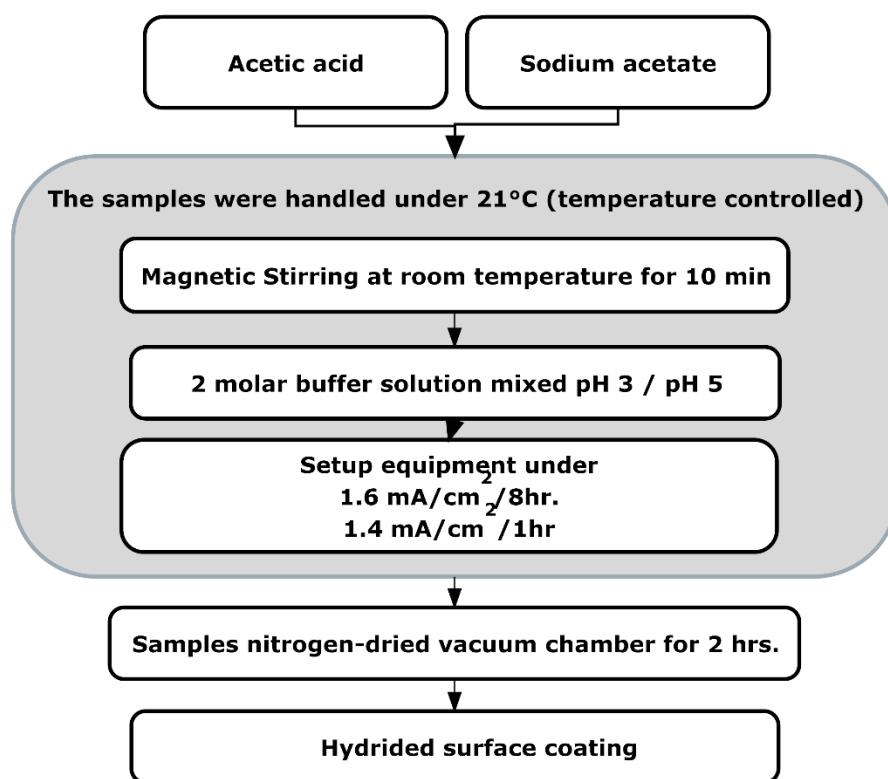


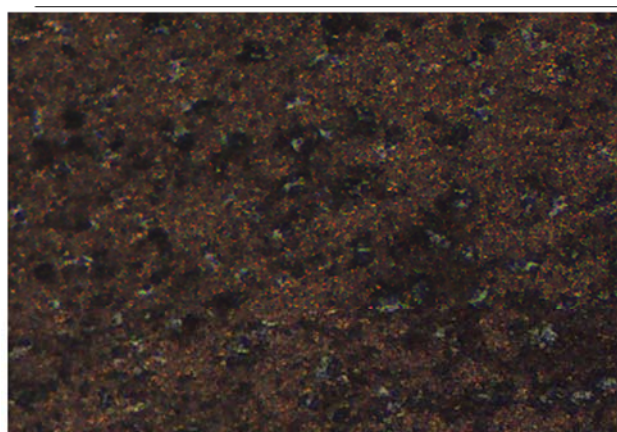
Figura 21 - Fluxograma do processo de polarização catódica pH 3/ 1,6 mA/cm²
Fonte: O autor

O equipamento utilizado para a realização dos ensaios eletroquímicos foi o potenciostato marca e modelo (AUTOLAB Metrohm, AUT85833) apresentado na figura 23 que usa o software Nova versão 1.1 o qual controla parâmetros como tempo do ensaio laboratorial e corrente. Os corpos de prova funcionaram como cátodo durante a redução catódica, enquanto um eletrodo de platina retangular foi utilizado como ânodo. Os corpos

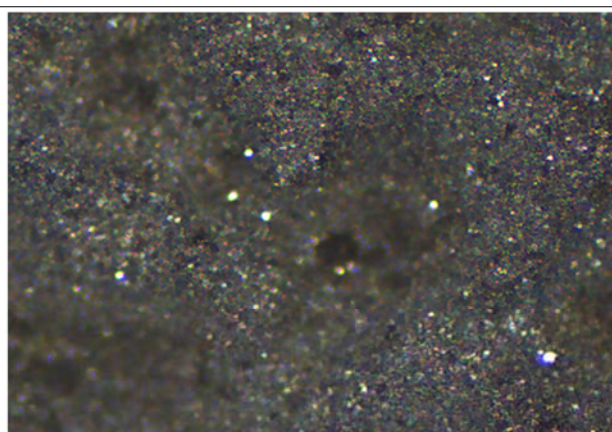
de prova foram processados durante 4 e 1 hora (Figura 21) respectivamente conforme a tabela 6. A figura 22 apresenta as micrografias da liga titânio após polarização catódica.

Tabela 6 - Descrição dos grupos experimentais pelo processo eletroquímico.

Grupo	Solução tampão	pH	Tempo	Densidades de corrente
P1	200 mL	3	8 horas	1,6 mA/cm ²
	2M			
	Ácido acético			
	Acetato de sódio			
P0	200 mL	5	1 hora	1,4 mA/cm ²
	2M			
	Ácido acético			
	Acetato de sódio			



Polarização catódica pH5 / 1 horas/ 1,4 mA/cm²



Polarização catódica pH3/ 8 horas/ 1,6 mA/cm²

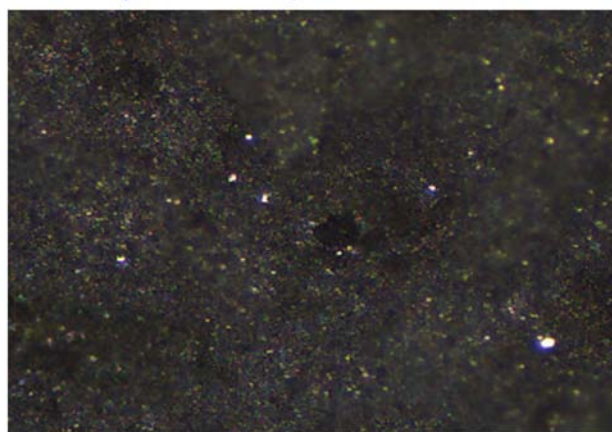
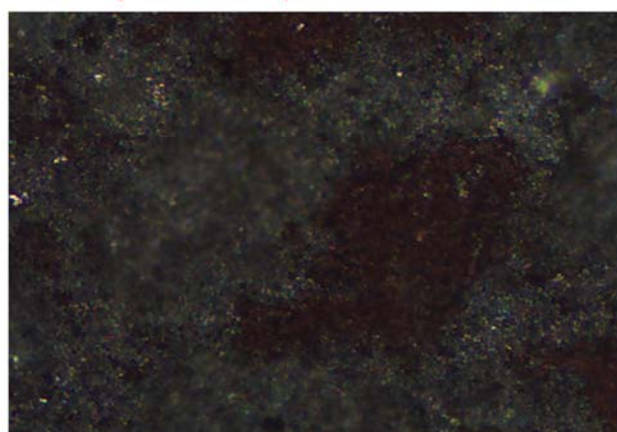


Figura 22 - Micrografia da liga titânio após polarização catódica diferentes pH à magnificação de 1000XO2 e 1500XOI2(Ph: Fase de contraste) Fonte: O autor

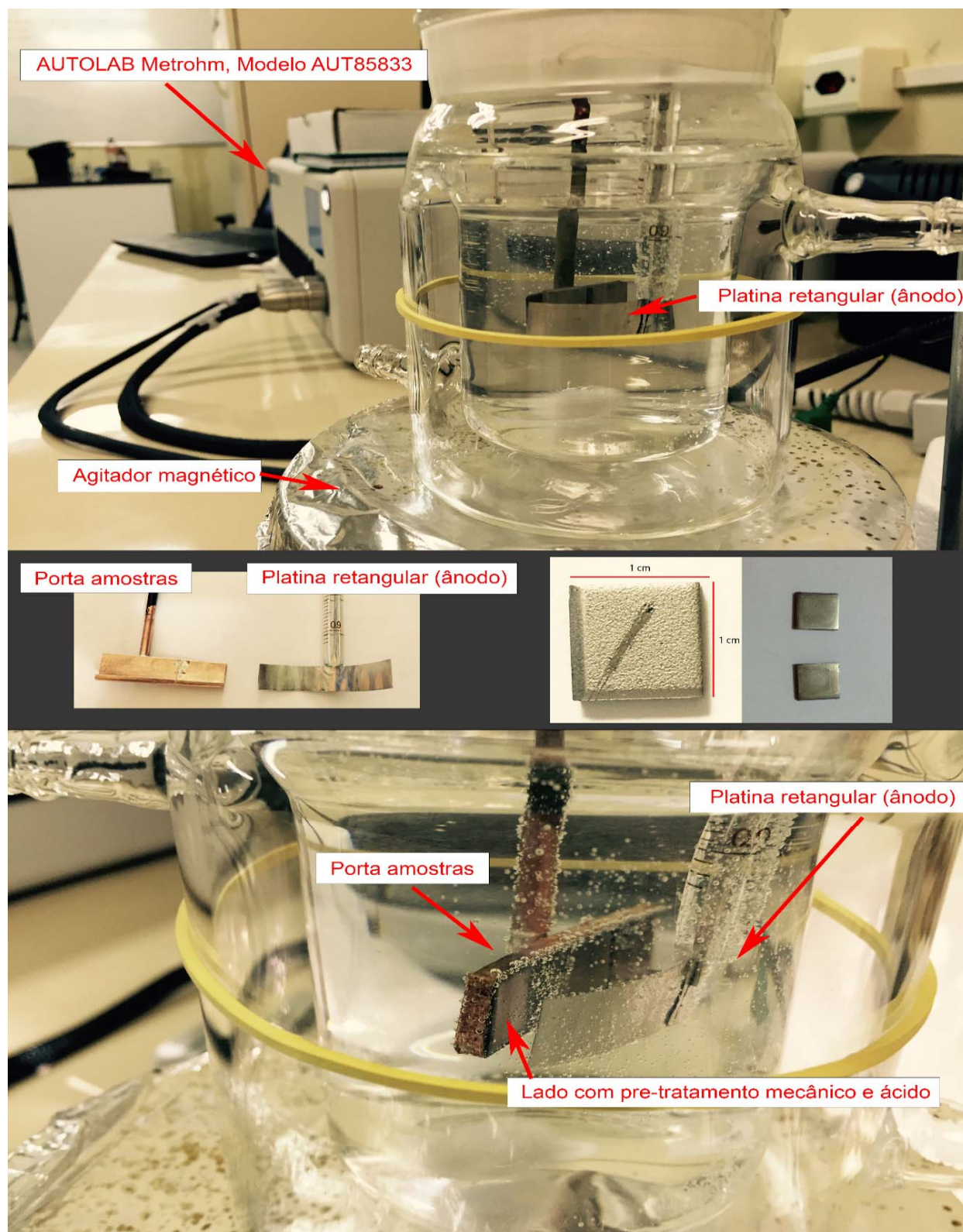


Figura 23 - Esquematização dos ensaios de polarização catódica
Fonte: O autor

4.2.5. Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva

Espectrômetro de dispersão de energia de raios X (EDX) é uma técnica que permite a caracterização da composição elementar de um microvolume de material que tem por base a análise do respectivo espectro de emissão de raios-X. O equipamento modelo e maca (EDX-720 – SHIMADZU) é um instrumento que determina qualitativamente e quantitativamente os elementos presentes em uma determinada amostra. Isto é possível através da aplicação de raios X na superfície da amostra e a posterior análise dos fluorescentes raios X emitidos. A técnica de fluorescência de raios X é não-destrutiva para todos os tipos de amostras, incluindo sólidos, líquidos e pós.

As análises foram realizadas após a calibração do equipamento. O porta amostra foi montado conforme especificação do fabricante do equipamento, utilizando a porta adequado, com fundo de filme 3520 POLYPROPYLENE 0,2mil (5 μ), específico para análise de XRF e EDX. O método utilizado foi de [quali-quant] easy-metal que determina os elementos e/ou metais presentes na superfície do material e os quantifica. As análises foram realizadas com o feixe do raio X operando em 1mm, analisando o material em duas faixas, Ti-U e Na-Sc (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise quantitativa de EDX dos elementos presentes nas superfícies de titânio revestidas com materiais híbridos

Grupos	Elementos presentes na superfície do material Faixas (Ti-U e Na-Sc)										
	% TiO ₂	% ZrO ₂	% SO ₃	% P ₂ O ₅	% CaO	% CuO	% K ₂ O	% In ₂ O ₃	% Fe ₂ O ₃	% SiO ₂	% SrO
G1	79.47	0.045	25.07	1.71	0.19	-	-	-	-	-	-
G2	73.93	-	24.00	1.78	0.28	0.02	-	-	-	-	-
G3	73.11	0.012	24.99	1.57	0.27	0.02	-	-	-	-	-
G4	76.24	-	22.39	1.10	0.25	0.01	-	-	-	-	-
G2-V2	72.54	0.045	18.70	2.14	28.93						
G5	73.04	-	24.15	1.61	0.09	0.02	0.97	0.16	-	-	-
G6	72.67	-	24.80	1.39	0.08	0.02	0.95	0.10	-	-	-
P1	67.59	-	31.00	1.28	0.10	0.02	-	-	0.01	-	-
P0	65.01	-	33.05	1.79	0.12	0.03	-	-	-		
GHOP1	99.966	-	-	-	0	0.034	-	-	0	0	0
GHOP2	98.438	-	-	-	0	0.04	-	-	0	1.522	0
GHOP3	99.43	-	-	-	0.148	0.042	-	-	0.078	0	0.303

4.2.6. Microscopia de Força Atômica, rugosidade e Topografia

A microscopia de força atômica (AFM) permite obter imagens reais da topografia de superfícies, em três dimensões e em escala atômica. Foi utilizado o equipamento da SHIMADZU modelo SPM-9600 utilizando o modo de força lateral (LFM).

Na operação do Microscópio de força atômica (AFM) uma sonda de dimensões atômicas é montada sobre um braço em movimento que percorre a amostra a ser analisada. À medida que a ponta se aproxima da superfície ocorrem deflexões do braço que são causadas pelas interações entre os átomos da sonda e da amostra. A sonda de AFM segue os contornos da superfície. Durante o deslocamento da ponta, o computador analisa, em cada ponto, a força de interação entre a ponta e a amostra e traça o diagrama das alturas, construindo a topografia (BOWEN; HILAL, 2009).

A técnica de AFM pode operar em dois modos de forças distintas: não-contato e contato. No modo de não-contato, a separação entre a ponta e a superfície da amostra é da ordem de 10 a 100 nm. Com separações menores, da ordem de Å, a ponta está em contato com a superfície da amostra (BOWEN; HILAL, 2009).

Para o presente trabalho o AFM (AutoProbe CP, Thermomicroscopes) foi operado em modo de contato intermitente em condições ambientais (25 °C e umidade relativa 50%). Para obter imagens topográficas, utilizou-se uma ponta de silício (UL 2.0), operando a uma frequência de ressonância de aproximadamente 320 kHz e taxa de varredura de 1 Hz.

A topografia das amostras de titânio com rugosidade tratadas pelas técnicas combinação das técnicas de tratamento mecânico, tratamento ácido, sol-gel dip-coating e polarização eletroquímica catódica foram avaliadas por microscopia de força atômica. A imagem 3D foi adquirida no modo de não contato. As figuras 24 até 27 apresentam as amostras tratadas pelo processo polarização eletroquímica catódica e as figuras 28 até 48 aquelas tratadas pelo processo sol-gel dip-coating.

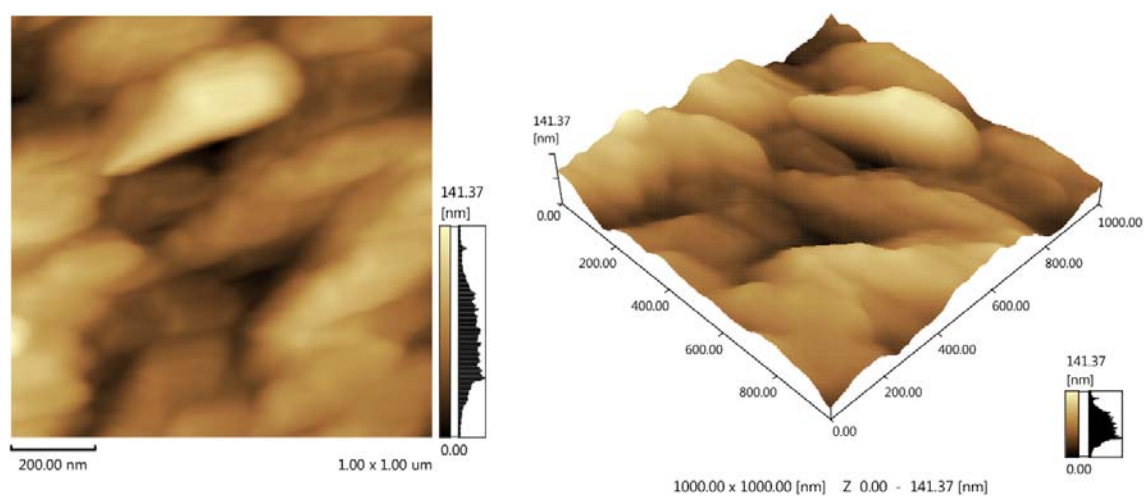


Figura 24 - P1 - AFM (1μm) polarização catódica (CH_3COOH - $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) /1,6 mA/cm²
 Fonte: O autor

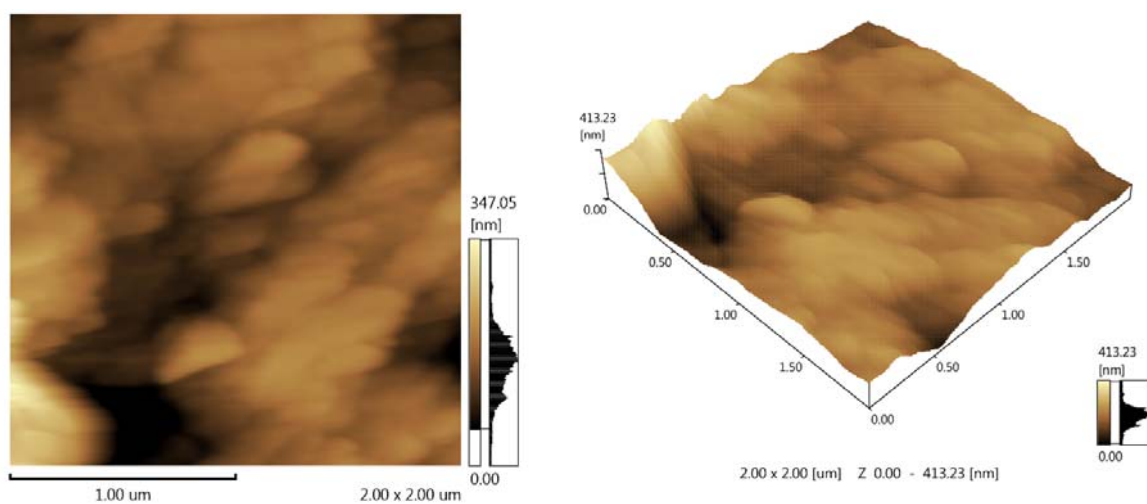


Figura 25 - P1 - AFM (2μm) polarização catódica (CH_3COOH - $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) /1,6 mA/cm²
 Fonte: O autor

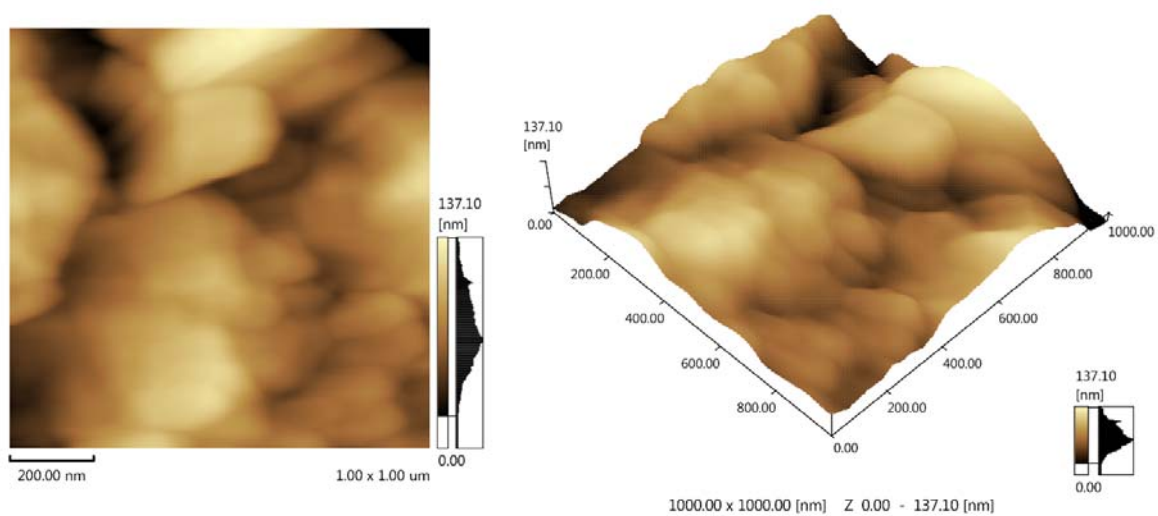


Figura 26 - P1- AFM (1μm) polarização catódica (CH_3COOH - $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) /1,6 mA/cm²
Fonte: O autor

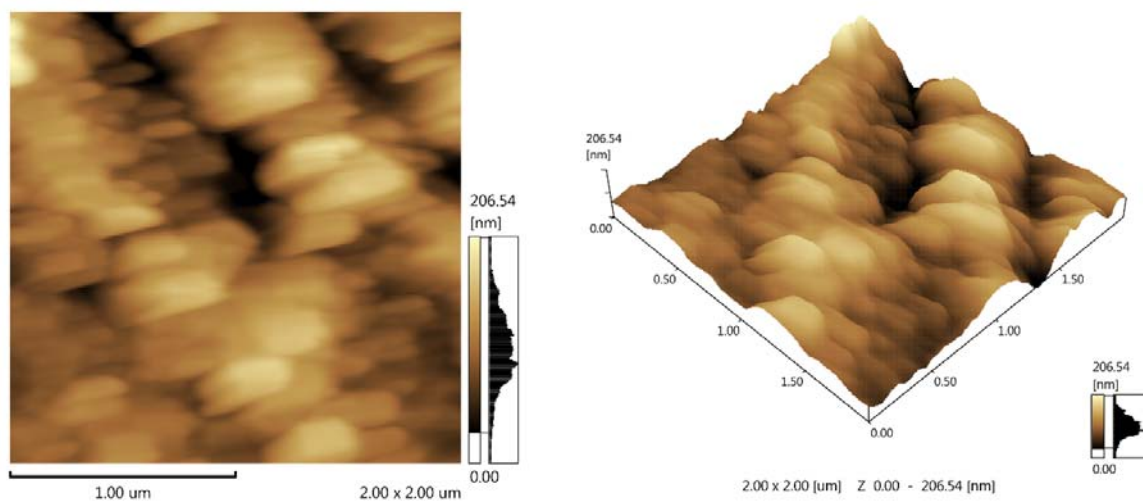


Figura 27 - P1- AFM 2μm solução tampão (CH_3COOH - $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) /1,6 mA/cm²
Fonte: O autor

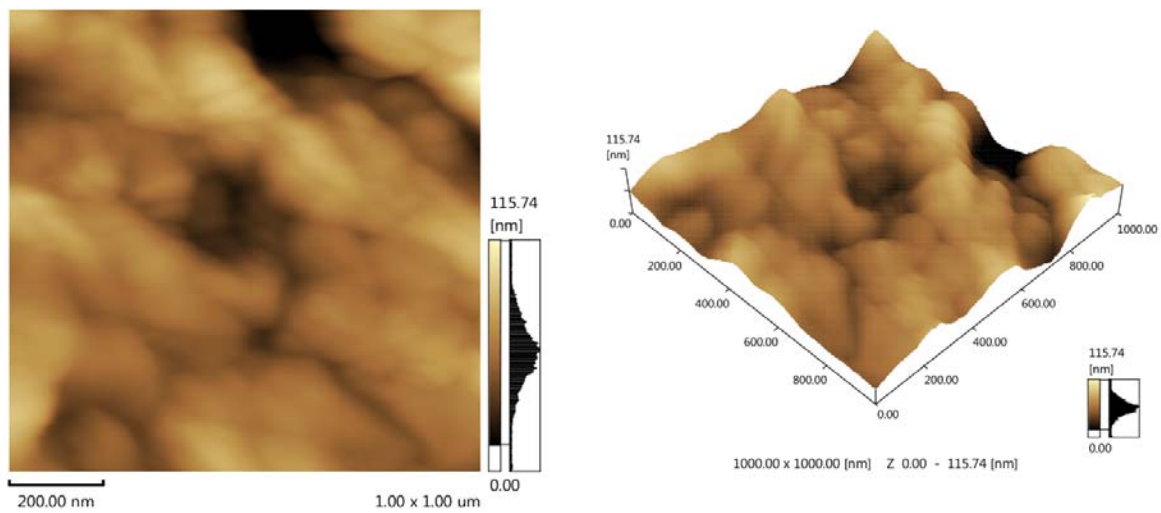


Figura 28 - G1- AFM 1μm do revestimento de ZrO₂/PEG [0,2 M]
Fonte: O autor

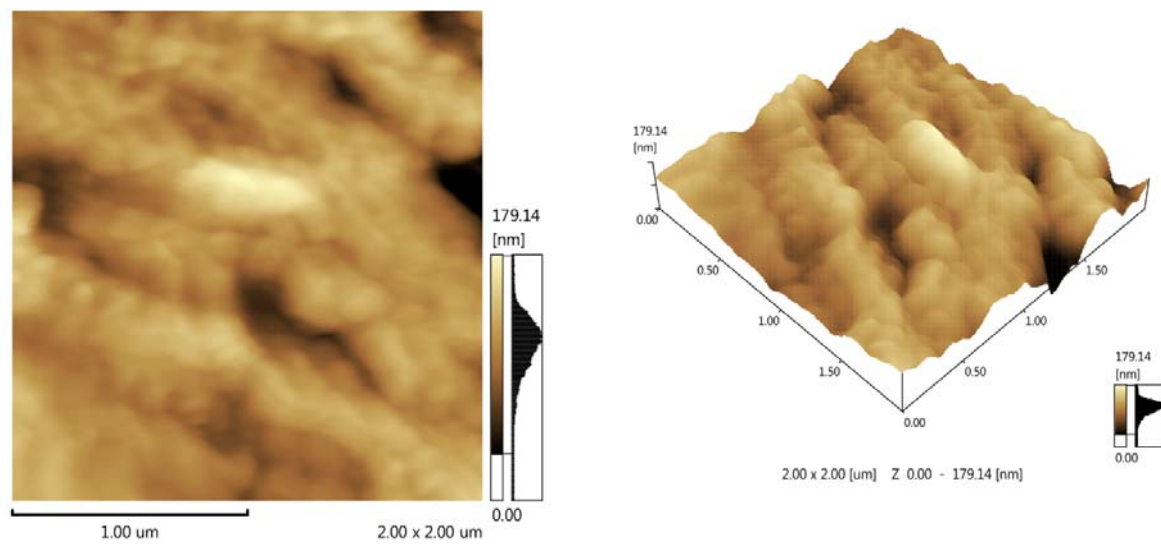


Figura 29 - G1- AFM 2μm do revestimento de ZrO₂/PEG [0,2 M]
Fonte: O autor

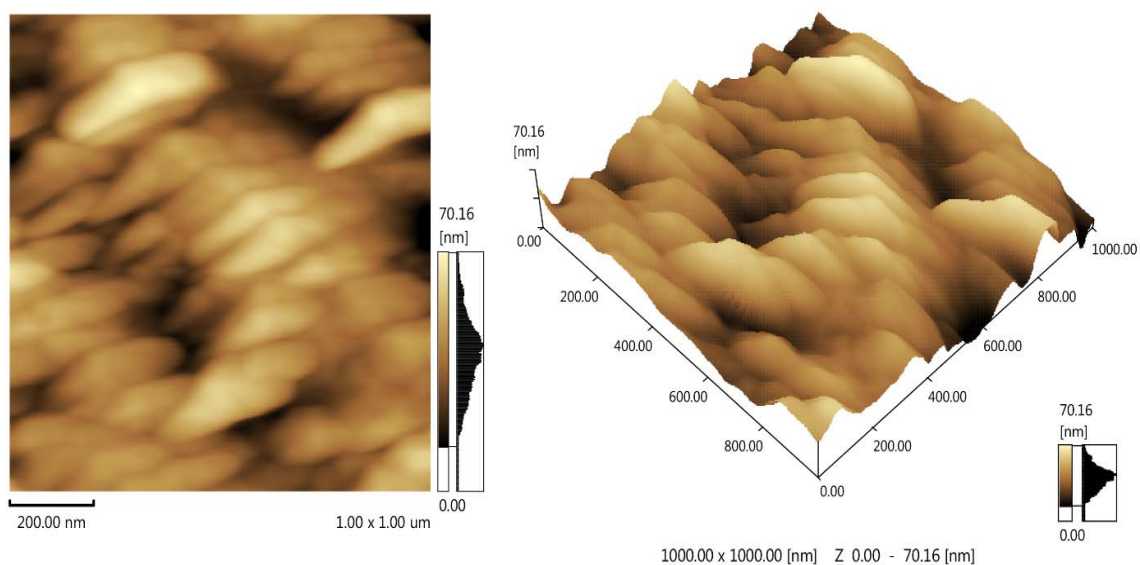


Figura 30 - G2- AFM 1 μm do revestimento de TiO_2/PEG [0,2 M]
Fonte: O autor

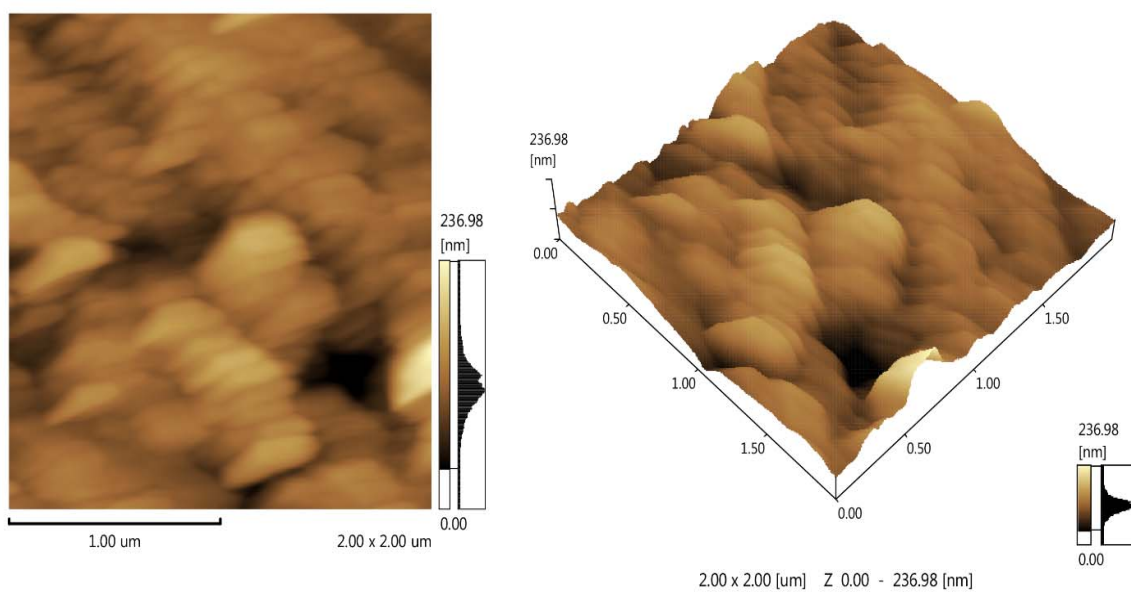


Figura 31 - G2- AFM 2 μm do revestimento de TiO_2/PEG [0,2 M]
Fonte: O autor

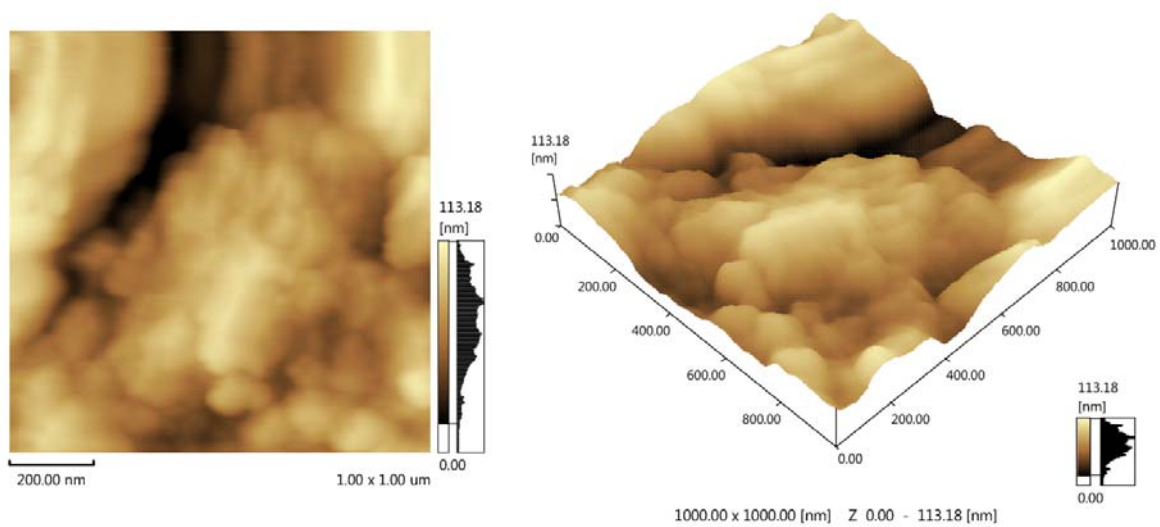


Figura 32 - G2- AFM 1 μm do revestimento de TiO_2/PEG [0,2 M]
Fonte: O autor

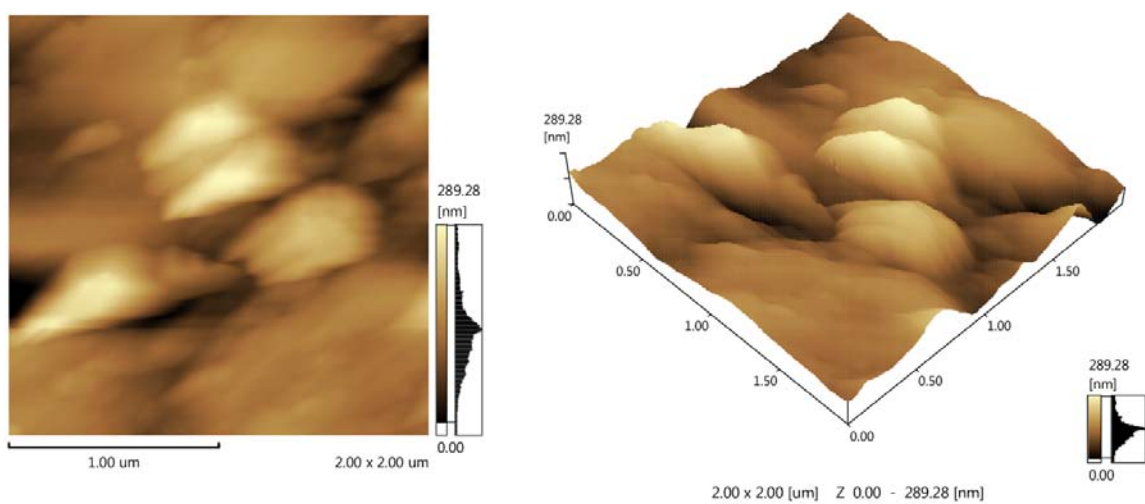


Figura 33 - G2- AFM 2 μm do revestimento de TiO_2/PEG [0,2 M]
Fonte: O autor

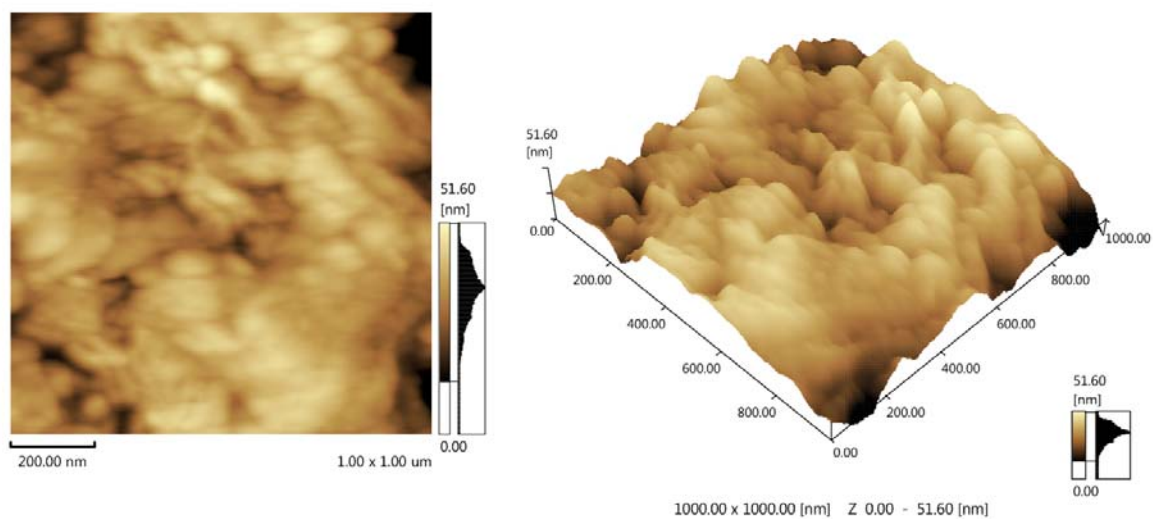


Figura 34 - G3- AFM 1 μm do revestimento de TiO_2 [0,2 M]: Li^+ (15%): Zr (15%)/PEG
Fonte: O autor

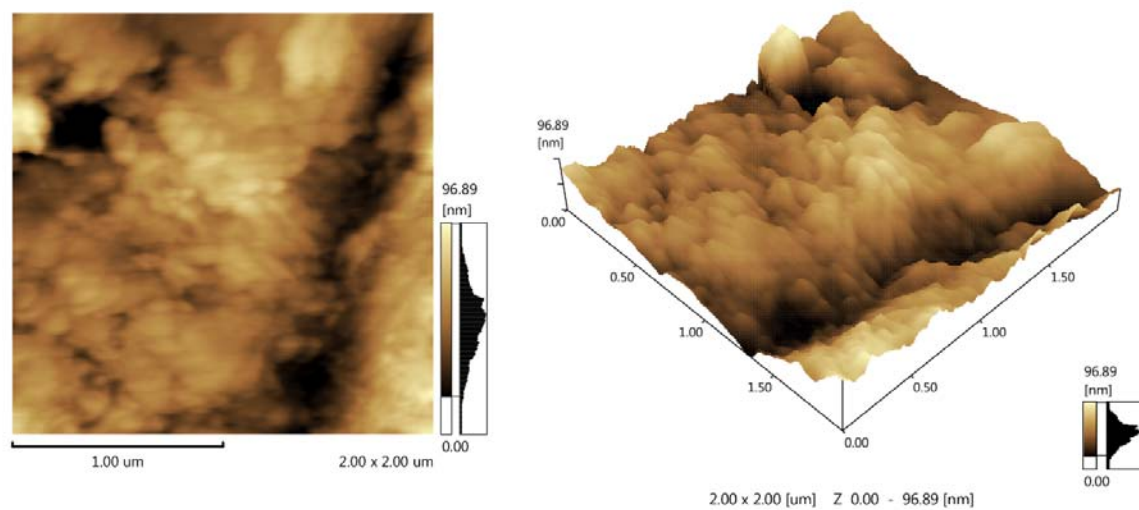


Figura 35 - G3- AFM 2 μm do revestimento de TiO_2 [0,2 M]: Li^+ (15%): Zr (15%)/PEG
Fonte: O autor

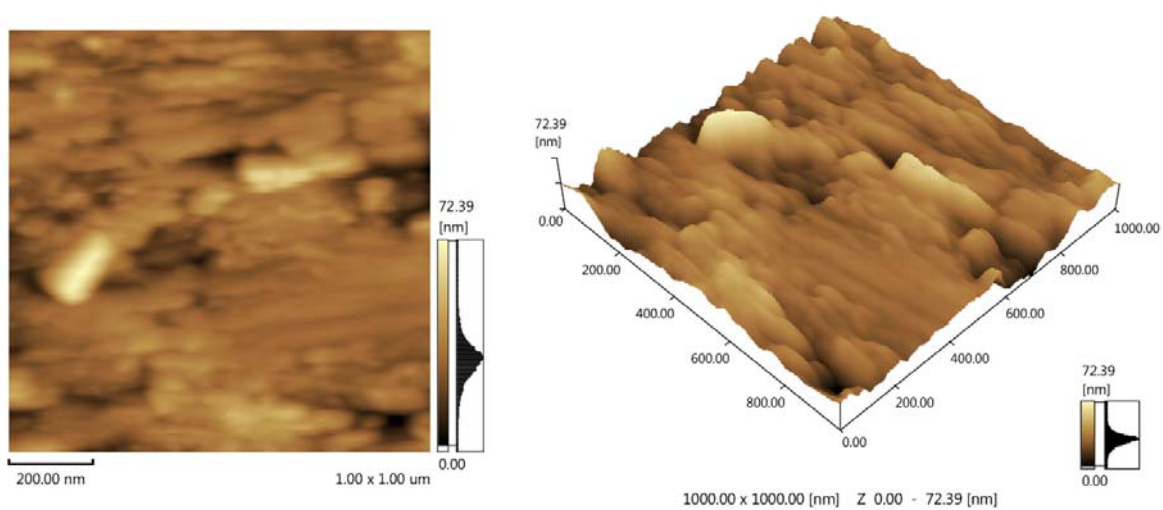


Figura 36 - G3- AFM 1 μm do revestimento de TiO_2 [0,2 M]: Li^+ (15%): Zr (15%)/PEG
Fonte: O autor

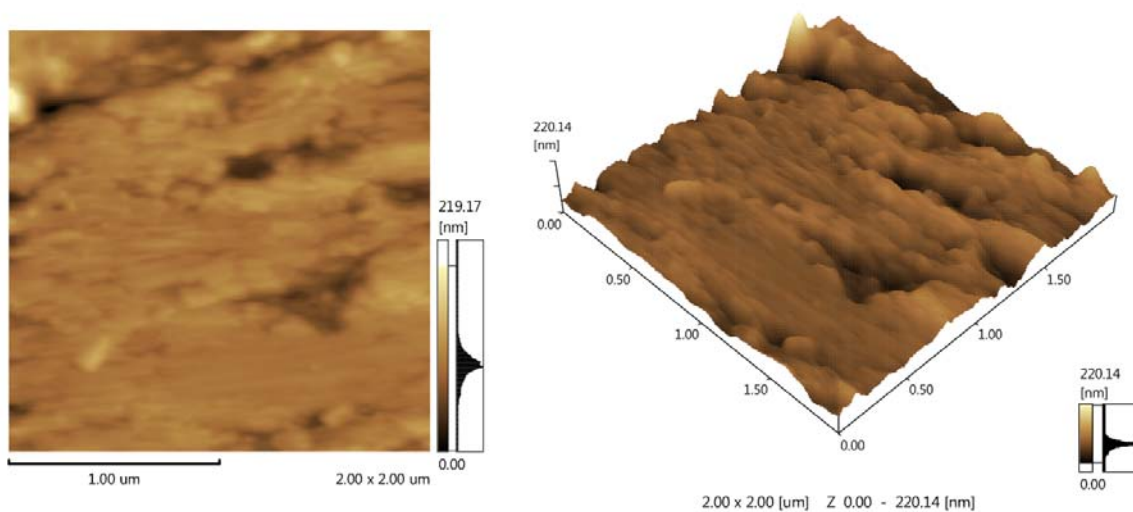


Figura 37 - G3- AFM 2 μm do revestimento de TiO_2 [0,2 M]: Li^+ (15%): Zr (15%)/PEG
Fonte: O autor

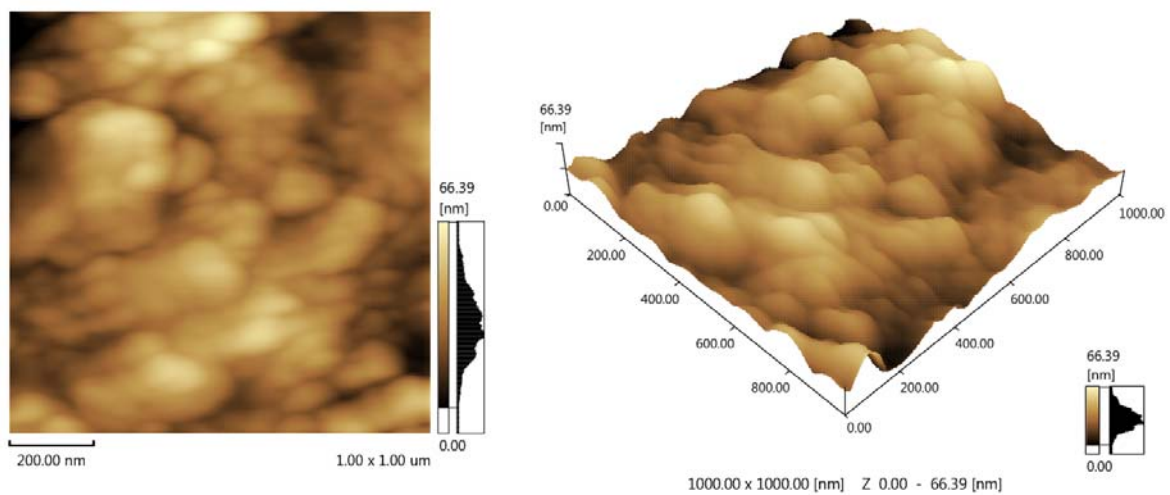


Figura 38 - G4- AFM 1 μm do revestimento de TiO_2 [0,2 M]: Li^+ (15%)/PEG
Fonte: O autor

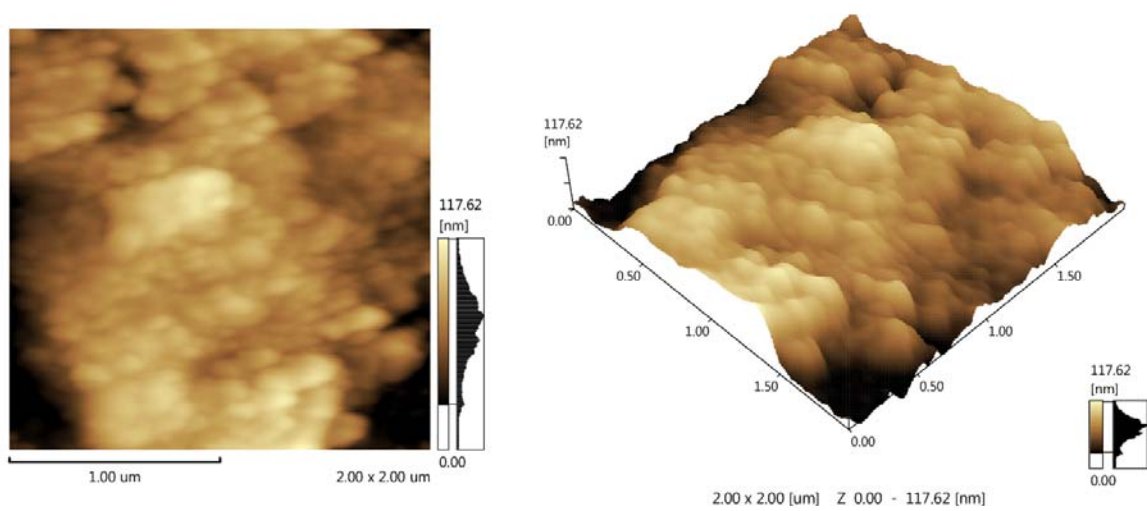


Figura 39 - G4- AFM 2 μm do revestimento de TiO_2 [0,2 M]: Li^+ (15%)/PEG
Fonte: O autor

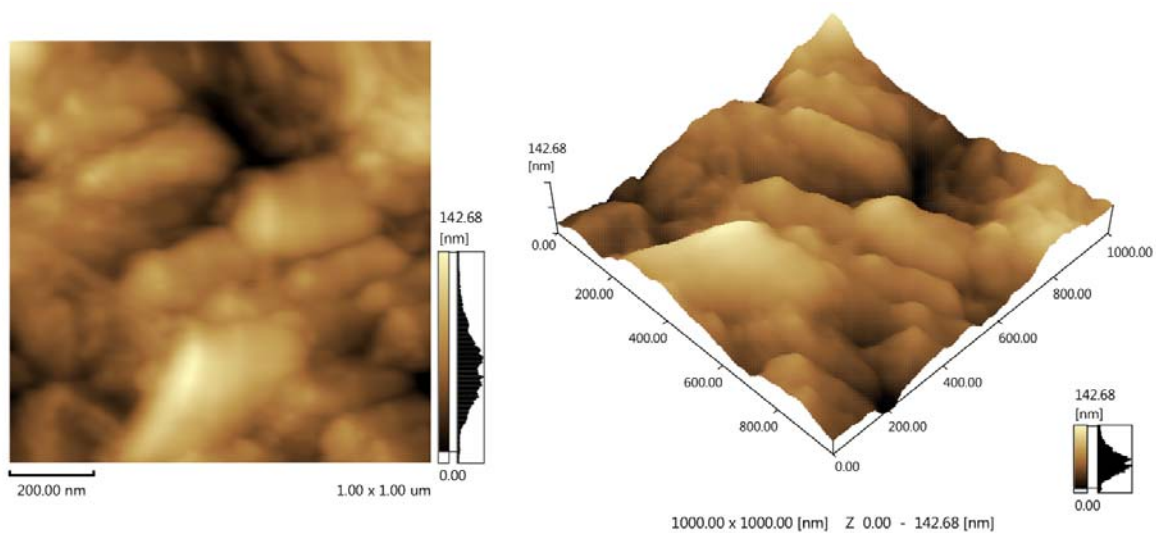


Figura 40 - G4- AFM 1 μm do revestimento de TiO_2 [0,2 M]: Li^+ (15%)/PEG
Fonte: O autor

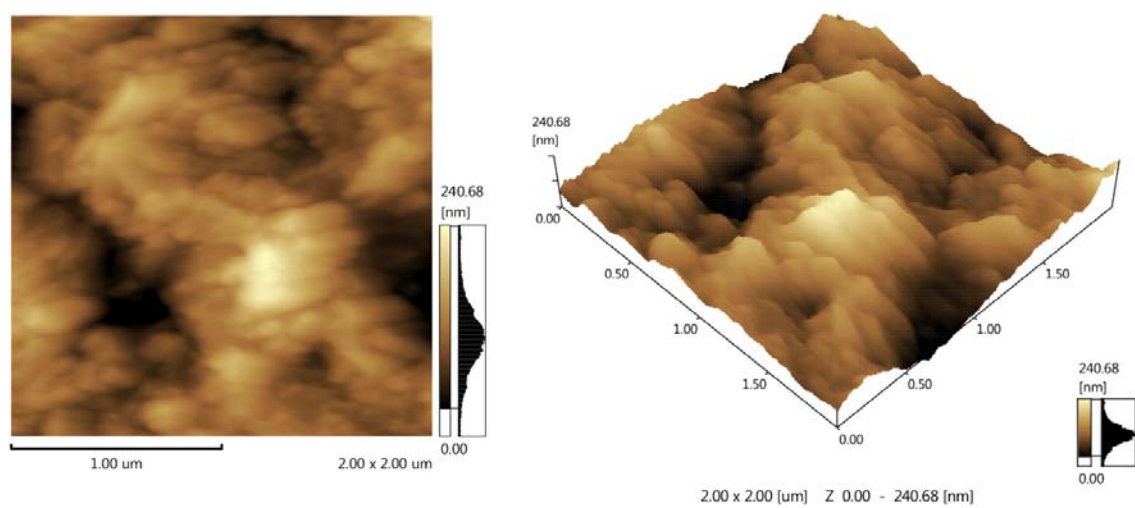


Figura 41 - G4- AFM 2 μm do revestimento de TiO_2 [0,2 M]: Li^+ (15%)/PEG
Fonte: O autor

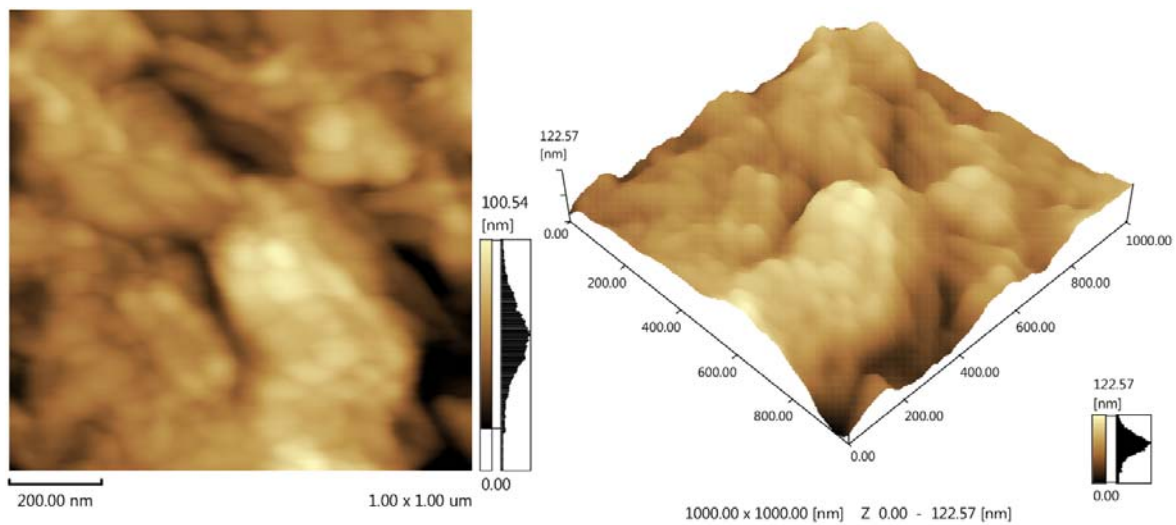


Figura 42 - G2-V2 - AFM 1 μm do revestimento de ZrO_2/PEG [2 M]
Fonte: O autor

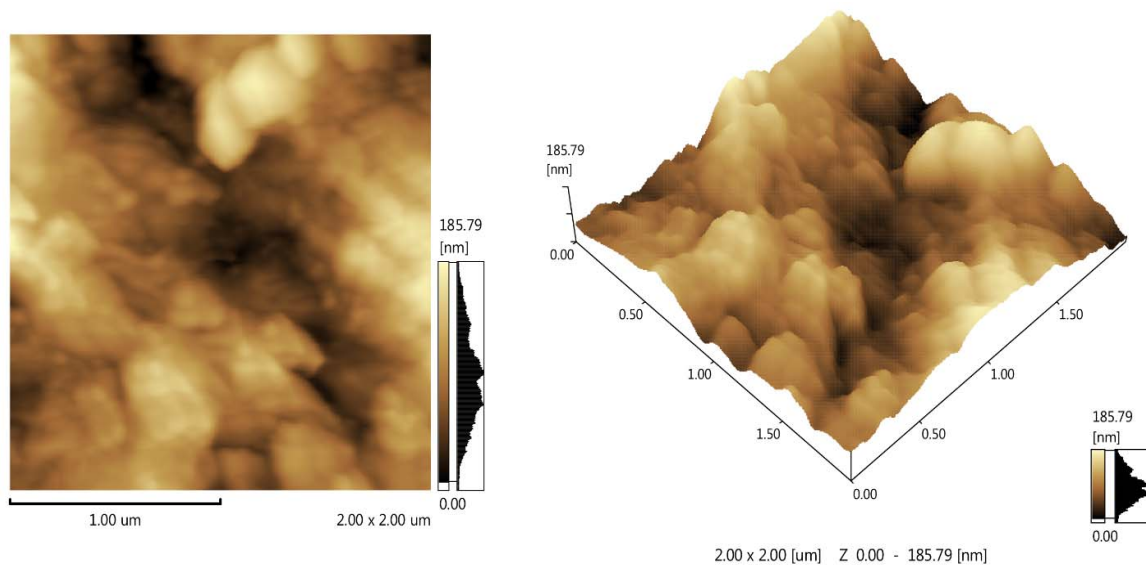


Figura 43 - G2-V2 - AFM 2 μm do revestimento de ZrO_2/PEG [2 M]
Fonte: O autor

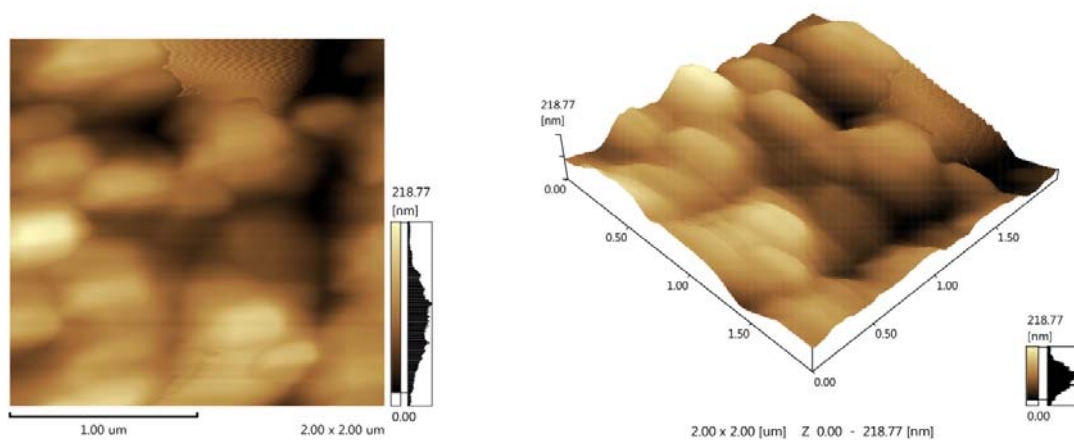


Figura 44 - GHOP1- AFM 1 μm do revestimento de ZrO_2/PEG [2 M]
Fonte: O autor

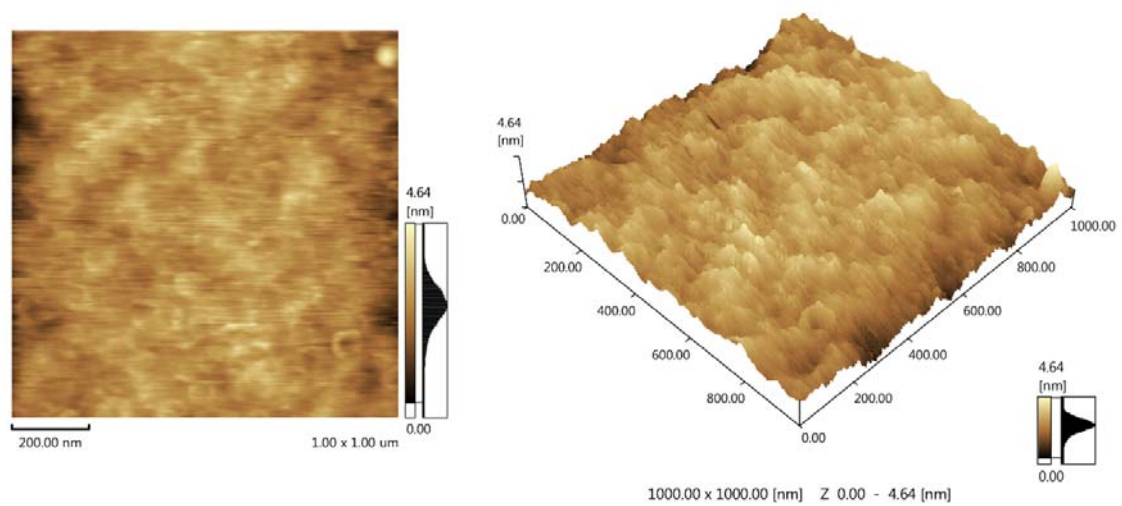


Figura 45 - GHOP2- AFM 1 μm do revestimento de ZrO_2 [2 M]: Li^+ (15%)/PEG
Fonte: O autor

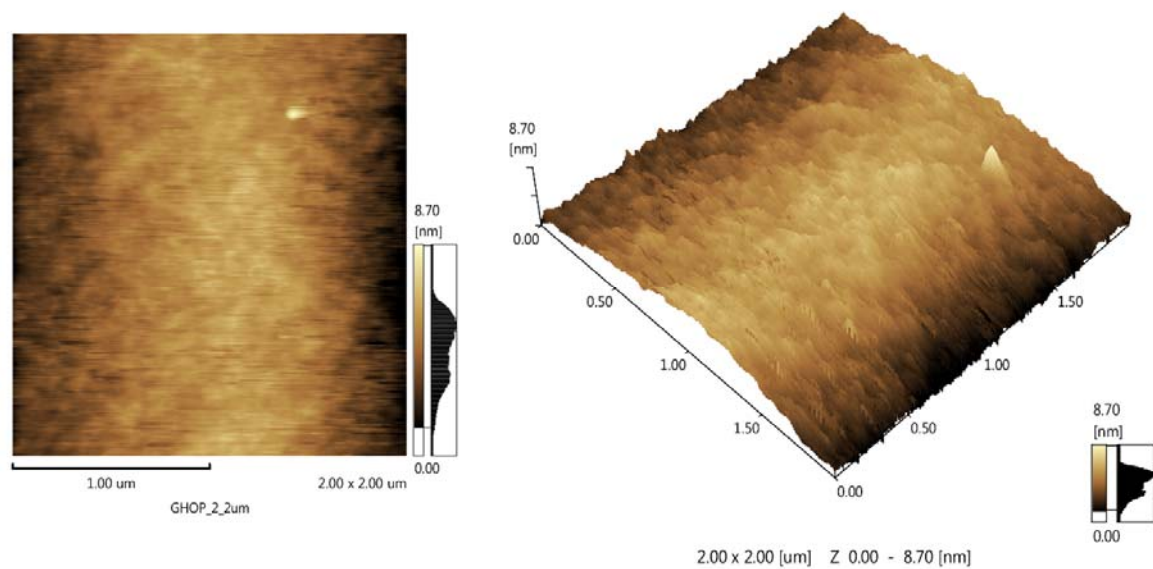


Figura 46 - GHOP2- AFM 2μm do revestimento de ZrO_2 [2 M]: Li^+ (15%)/PEG
Fonte: O autor

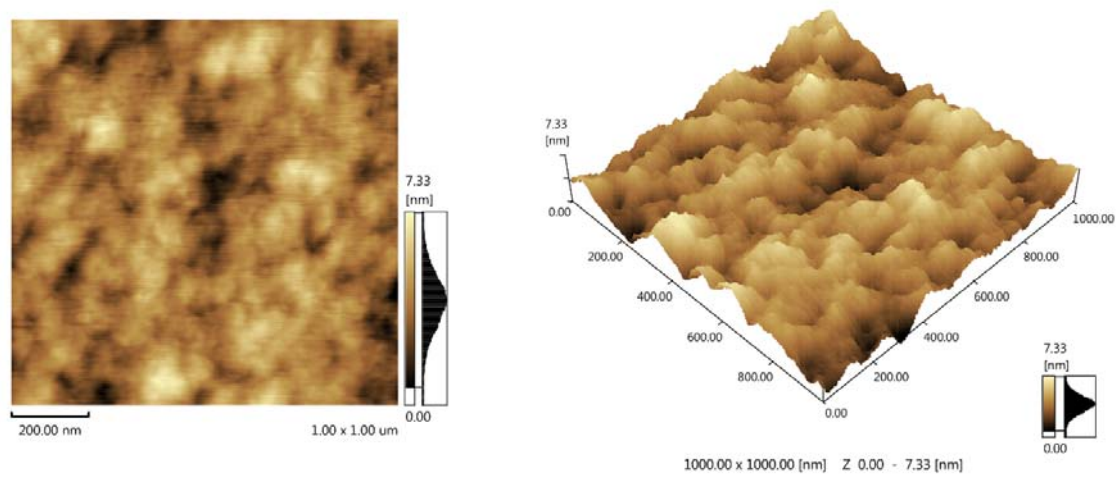


Figura 47 - GHOP3- AFM 1μm do revestimento de ZrO_2 [2 M]: Li^+ (15%): Sr (15%)/PEG
Fonte: O autor

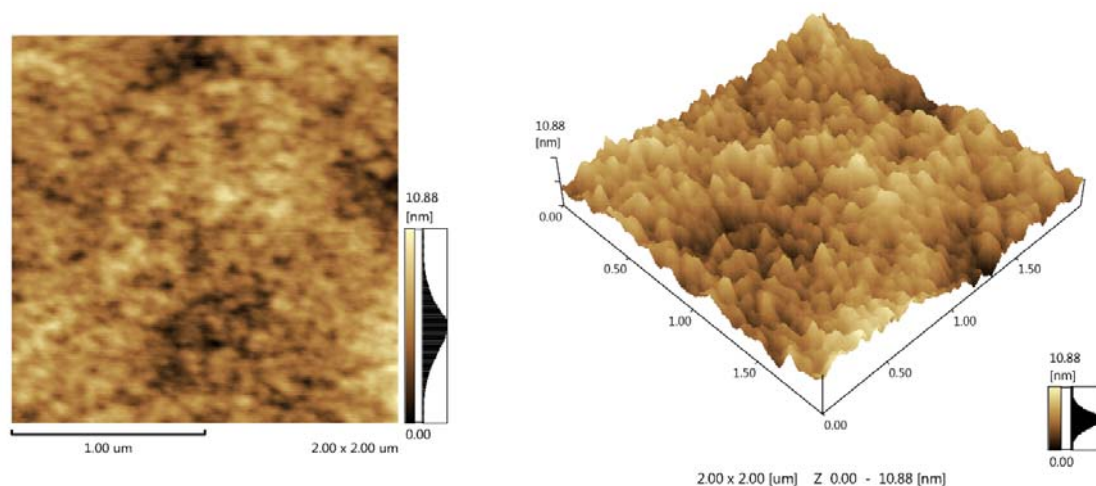


Figura 48 - GHOP3- AFM 2μm do revestimento de ZrO₂ [2 M]: Li⁺ (15%): Sr (15%)/PEG
Fonte: O autor

4.2.7 Testes de citotoxicidade

4.2.7.1 Cultura de células

Uma linha de fibroblastos imortalizados (3T3/NIH) foram cultivadas em meio *DMeM* (*Dulbecco's modified eagle's medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), 2% de l-glutamina, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) (giBco-Brl). As células foram mantidas em 75 cm³ cultura celular em ambiente controlado (37°C, 5% CO₂), até alcançar a subconfluência (80%), sendo lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Gibco®), para remover os metabolitos das células. Após, 5 ml de tripsina / EDTA a 0,25% (Gibco®) foi aplicado nas células durante 5 minutos para desprendimento celular. Após foi realizada a inativação da tripsina com *DMeM*, e as células foram transferidas para tubos de falcão e centrifugadas durante 5 minutos sob 1000 rpm. O sobrenadante foi removido e o sedimento celular foi suspenso em 3 mL de meio (*DMeM* / FBS 90:10). Assim, foram tomados 20 μL de suspensão para contagem celular num hemocítmetro. Todos os materiais encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Materiais utilizados para cultura celular e Ensaio MTT

Reagentes e/ou célula	Abreviação	Marca
Fibroblastos imortalizados	3T3/NIH	-
<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>	DMeM	Cultilab®
Solução salina tamponada com fosfato	PBS	Gibco®
Soro fetal bovino	SFB	Cultilab®
l-glutamina	-	giBco-Brl
Penicilina (100 U/mL)	-	giBco-Brl
Estreptomicina (100 mg/mL)	-	giBco-Brl
Tripsina/EDTA 0,25%		Gibco®
3-(4,5- dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide	MTT	-
Placa de 48 poços	-	-
Garrafas para cultivo celular	-	-

4.2.7.2 Adesão Celular em Ensaio MTT

Para o ensaio de adesão celular, os corpos de prova de titânio esterilizados (TI F67 GR2, 1x1 cm² e 2,25 mm de espessura) (N = 10 por grupo) foram inseridos em placas de 48 poços com a superfície tratada voltada para cima (figura 49). Inicialmente, 10x10⁴ células suspensas em 800 µL de meio foram semeadas em cada poço. Para o controle positivo, a mesma quantidade de células foi semeada em poço sem os corpos de prova de titânio (N = 10), e para o controle negativo, foram depositados 800 µL de meio nos poços sem células. A placa foi mantida numa incubadora com atmosfera controlada (37 °C, 5% CO₂) durante 24 horas com o intuito de promover e ocorrer a adesão celular. Subsequentemente, os corpos de prova de titânio foram transferidos delicadamente, com o auxílio de uma pinça estéril, para uma nova placa de 48 poços, com o objetivo de transferir apenas as células de titânio aderidas. Seguidamente, um meio fresco (800 µL) era depositado acima da placa de titânio e os meios dos controles positivos e negativos também foram trocados. A placa permaneceu durante mais 24 horas numa incubadora. Depois disso, o meio foi suavemente removido e os corpos de prova de titânio e os controles dos poços foram lavados com 800 µL de PBS.

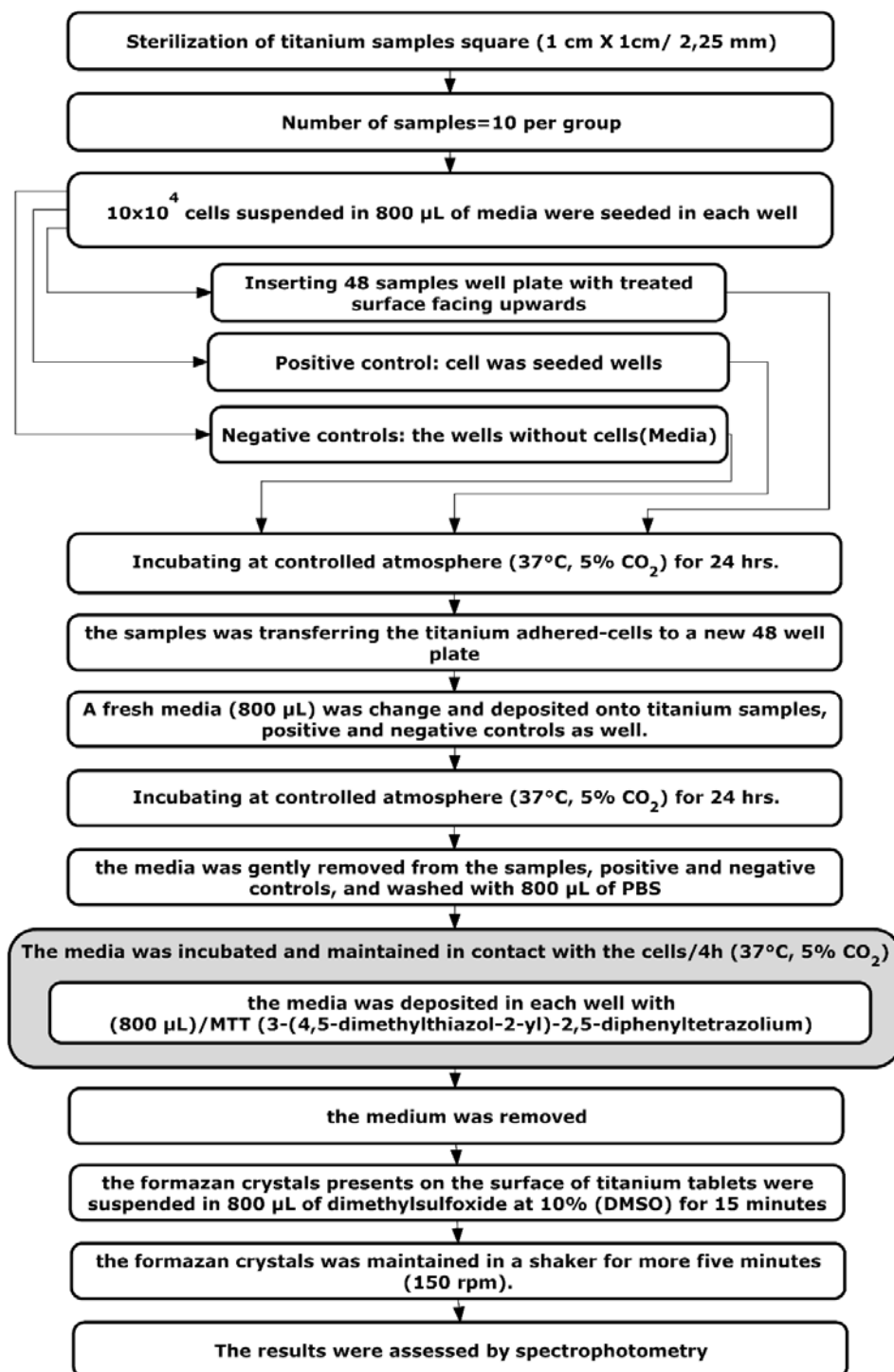


Figura 49 - Fluxograma de adesão Celular em Ensaio MTT sob superfície de titânio.
Fonte: O autor

O meio foi depositado em cada poço (800 µL) com a adição de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) na concentração de 0,5 mg/mL (Sigma Aldrich®) e mantidos em contato com as células durante 4 h (37 ° C e 5% de CO₂). Após a

incubação, o meio foi removido e os cristais de formazano presentes nas superfícies tratadas dos corpos de prova de titânio foram suspensos em 800 µL de dimetilsulfóxido a 10% (DMSO) durante 15 minutos e mantidos num agitador durante mais cinco minutos (150 rpm). Os resultados foram avaliados por espectrofotometria (Universal ELISA reader- wavelength of 540 nm), sendo os valores de absorbância considerados como indicadores de proliferação celular.

A descrição dos dados provenientes do teste *in vitro* foi feito mediante análise descritiva e analítica. Foi usado o software SigmaPlot software versão 12.0 (Systat Software, Inc). Inicialmente foi realizado o teste de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. A análise de variância de comparação entre grupos foi mediante ANOVA ou Kruskal Wallis (dependendo da distribuição) e comparação múltipla mediante o teste de Tuckey ou Dunnet com nível de significância 5% ($p < 0.05$)

A figura 45 apresenta as medias de células presentes por grupo obtidas pelo teste de proliferação celular dos revestimentos biomiméticos de titânio. Na tabela 9 podem ser observados os dados descritivos referentes às medias e desvios padrão referentes à viabilidade celular de acordo com cada grupo e etapa estudados. De forma geral pode ser observado que todos os grupos promoveram proliferação celular, sendo que os grupos 1 e 2 permitiram maior crescimento celular.

Na Etapa 1, o grupo G3 apresentou a maior media de crescimento celular seguido do grupo G1 (Figura 51). Houve diferenças estatísticas entre os grupos controle e todos os grupos experimentais. Os grupos G4 e G1 não foram diferentes estatisticamente, mas foram diferentes aos grupos G2 (Tabela 10). Na etapa 2, o grupo G6 apresentou a maior media de crescimento celular seguido do grupo G2 (Figura 52). Houve diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos experimentais P1, G5 e G2. Os grupos G6 e G2 não foram diferentes estatisticamente, mas foram diferentes aos grupos G5 e P1 (Tabela 12). Na etapa 3, o grupo G4 apresentou a maior media de crescimento celular seguido do grupo G2 (Figura 53). Houve diferenças estatísticas entre o grupo controle e todos os grupos experimentais. Os grupos G4 e G2 não foram diferentes estatisticamente, mas foram diferentes aos grupos G0, G1, G3 e G5 (Tabela 14).

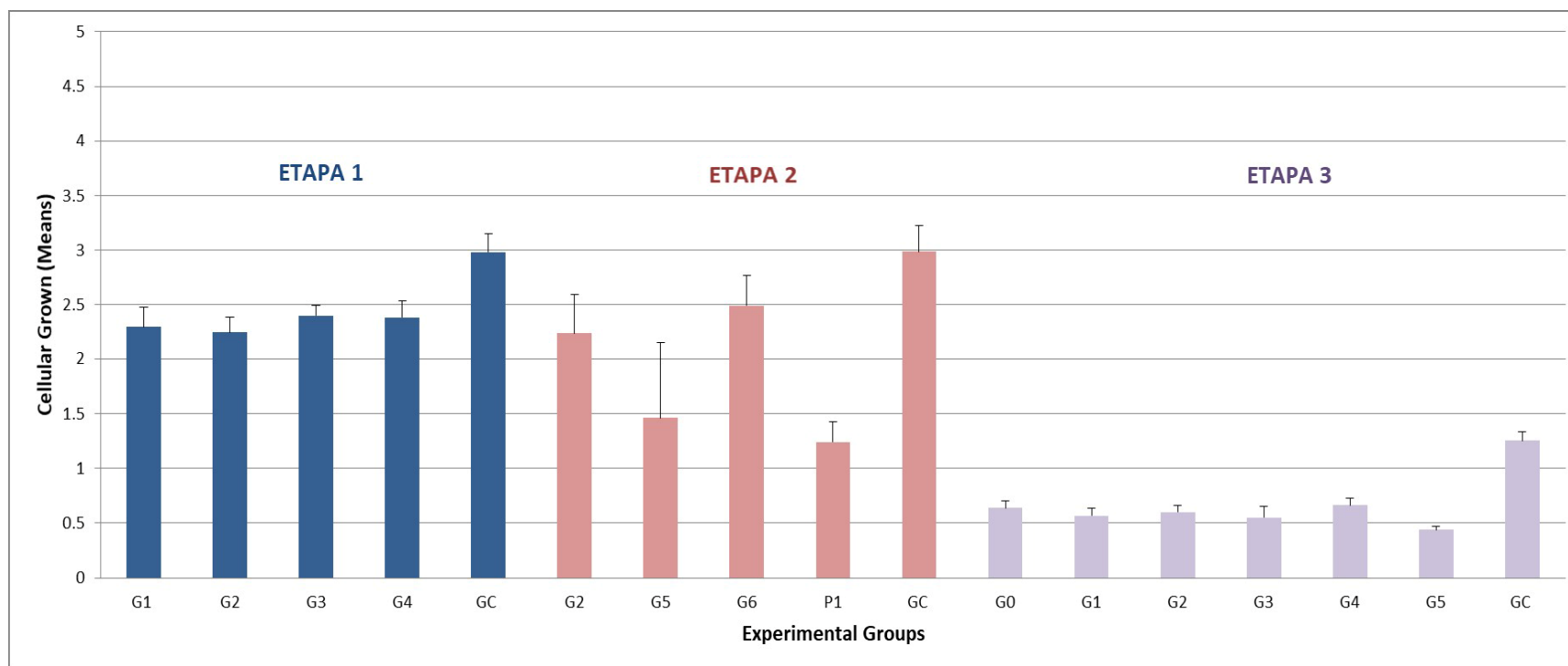


Figura 50 - Teste de citotoxicidade com amostras de revestimentos biomiméticos-Ti com diferentes técnicas.

Fonte: O autor

Tabela 9 - Dados descritivos de acordo com cada grupo e etapa estudada

Grupo de Estudo	Etapa 1					Etapa 2					Etapa 3						
	G1	G2	G3	G4	GC	G2	G5	G6	P1	GC	G0	G1	G2	G3	G4	G5	GC
	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean
	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)
Viabilidade celular	2.300	2.249	2.402	2.385	2.983	2.085	1.793	2.589	1.254	2.930	0.620	0.579	0.615	0.539	0.665	0.439	1.252
	(0.176)	(0.139)	(0.096)	(0.156)	(0.170)	(0.358)	(0.690)	(0.278)	(0.182)	(0.240)	(0.061)	(0.070)	(0.063)	(0.100)	(0.062)	(0.031)	(0.078)

SD: Desvio padrão, PM=Polimento mecânico, AC=Ataque ácido, Etapa1 [GC= grupo controle, G1= ZrO₂/PEG [2 M], G2 = TiO₂/PEG [2 M]. G3 = TiO₂ [2 M]: Li (15%): Zr (15%)/PEG, G4 = TiO₂ [2 M]: Li (15%)/PEG] **Etapa2** [GC= grupo controle, G2= ZrO₂/PEG [2 M], G5= ITO (Sim NaCl a 0,9%), G6 = ITO (Com NaCl a 0,9%), P1 = Solução tampão (CH₃COOH-C₂H₃NaO₂)], **Etapa 3**[GC= grupo controle, G0= Polimento mecânico, G1= PM/AC (Sim NaCl a 0,9%), G2= Ataque ácido, G3 = PM/AC (Com NaCl a 0,9%), G4 = sim tratamento, G5= PM/AC]

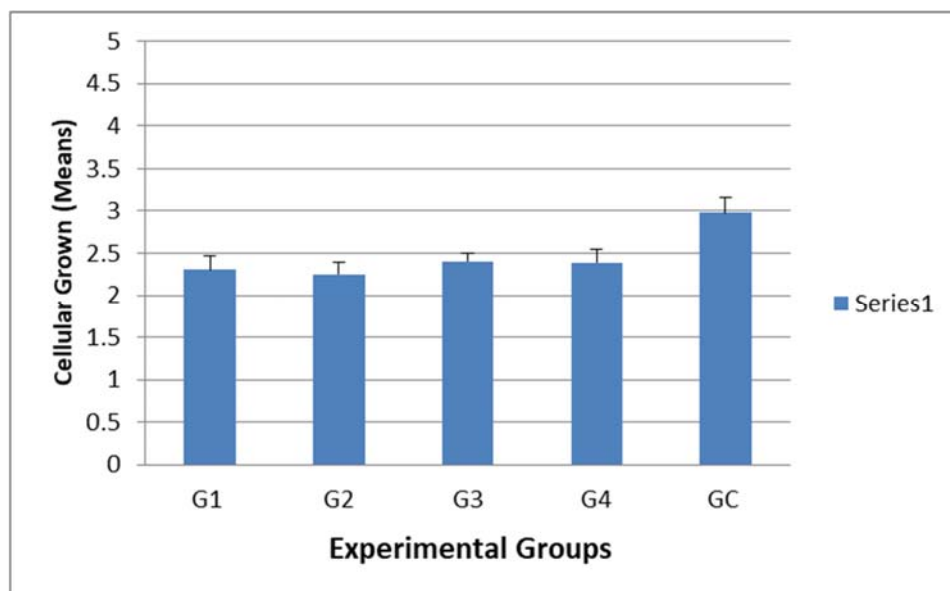


Figura 51 - Teste de citotoxicidade dos revestimentos pelo processo sol-gel dip coating com diferentes sóis. Fonte: O autor

Tabela 10 - ANOVA para comparações entre os grupos experimentais Etapa 1

Grupo de	G1	G2	G3	G4	GC
Estudo	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean
Etapa 1	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)
Viabilidade	2.300	2.249	2.402	2.385	2.983
celular	(0.176)bc	(0.139)c	(0.096)b	(0.156)b	(0.170)a

SD: Desvio padrão, diferentes letras e símbolos, significa diferença estatística ($p < 0.05$)

Tabela 11 – Descrição dos grupos experimentais da etapa 1

Nome do Grupo	Descrição do Grupo
GC	Grupo controle
G1	ZrO ₂ /PEG [2 M]
G2	TiO ₂ /PEG [2 M]
G3	TiO ₂ [2 M]: Li ⁺ (15%): Zr (15%)/PEG
G4	TiO ₂ [2 M]: Li ⁺ (15%)/PEG

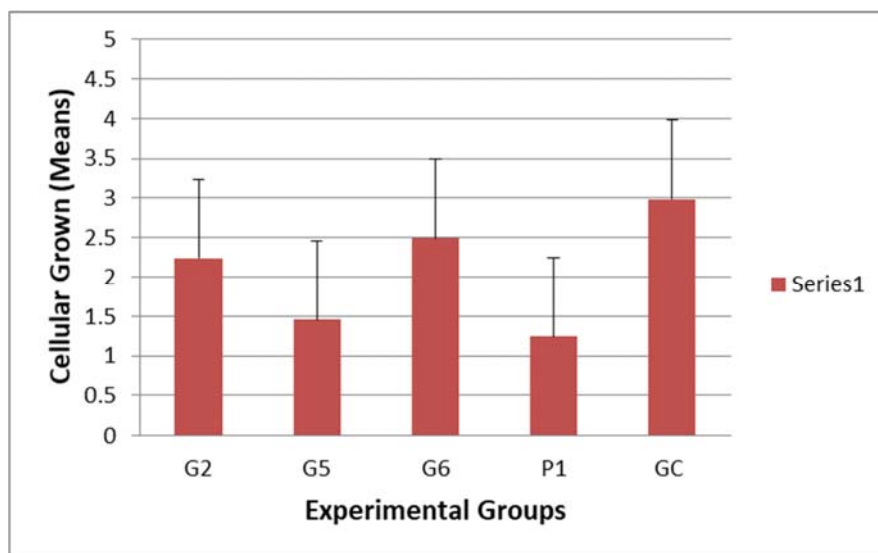


Figura 52 - Teste de citotoxicidade dos revestimentos pelo processo sol-gel dip coating e polarização eletroquímica
Fonte: O autor

Tabela 12 - Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos G experimentais (GC, G2, G5, G6, P1) e teste de Dunn para comparações entre grupos da etapa 2

Grupo de	G2	G5	G6	P1	GC
Estudo	Median	Median	Median	Median	Median
Etapa 2	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)
Viabilidade	2.241	1.459	2.493	1.240	2.987
celular	(0.358) ^b	(0.690) ^c	(0.278) ^{ab}	(0.182) ^d	(0.240) ^a

SD: Desvio padrão, diferentes letras e símbolos, significa diferença estatística ($p < 0.05$)

Tabela 13 Descrição dos grupos experimentais da etapa 2

Nome do Grupo	Descrição do Grupo
GC	Grupo controle
G2	ZrO ₂ /PEG [2 M]
G5	ITO (Sim NaCl a 0,9%)
G6	ITO (Com NaCl a 0,9%)
P1	Solução tampão (CH ₃ COOH- C ₂ H ₃ NaO ₂)

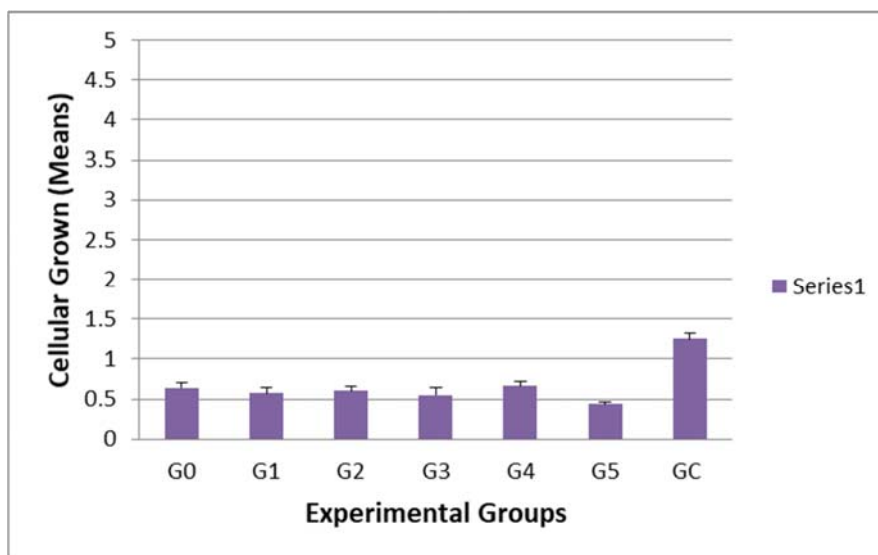


Figura 53 - Teste de citotoxicidade dos corpos de prova pelo pré-tratamentos
Fonte: O autor

Tabela 14 - ANOVA para comparações entre os diferentes grupos estudados etapa 3 G (G0, G1, G2, G3, G4, G5)

Grupo de	G0	G1	G2	G3	G4	G5	GC
Estudo	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean
Etapa 3	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)	(SD)
Viabilidade	0.639	0.569	0.601	0.550	0.663	0.439	1.252
celular	(0.061) ^b	(0.070) ^b	(0.063) ^d	(0.100) ^c	(0.062) ^d	(0.031) ^c	(0.078) ^a

SD: Desvio padrão, diferentes letras e símbolos, significa diferença estatística ($p < 0.05$)

Tabela 15 – Descrição dos grupos experimentais da etapa 3

Nome do Grupo	Descrição do Grupo
GC	Grupo controle
G0	Polimento mecânico
G1	PM e AC (Sim NaCl a 0,9%)
G2	Ataque ácido
G3	PM e AC (Com NaCl a 0,9%)
G4	Sim tratamento
G5	Polimento mecânico/Ataque ácido

PM: Polimento mecânico, AC: Ataque ácido

5 Artigo 1

Electrochemical cathodic polarization, a simplified method that can modified and increase the biological activity of titanium surfaces: A Systematic Review ¹

Short title: Systematic Review of an electrochemical method to modified titanium surface.

Jose Carlos Bernedo Alcazar^{1¶}, Mabel Miluska Suca Salas^{1,2¶}, Marcus Cristian Muniz Conde^{1¶}, Luiz Alexandre Chisini^{1¶}, Flávio Fernando Demarco^{1,3¶}, Sandra Beatriz Chaves Tarquinio^{1¶}, Neftali Lenin Villarreal Carreño^{1,4¶*}

¹ Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

² Graduate Program in Dentistry, Science Faculty of Tocantins, Tocantins, Brazil.

³Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

⁴Post-Graduate Program in Science and Material Engineering, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

*** Corresponding author:**

E-mail: neftali@ufpel.edu.br

[¶] These authors contributed equally to this work.

¹ Artigo publicado no periódico PLOS ONE (DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155231>)

Abstract

Background. The cathodic polarization seems to be an electrochemical method capable of modifying and coat biomolecules on titanium surfaces, improving the surface activity and promoting better biological responses.

Objective. The aim of the systematic review is to assess the scientific literature to evaluate the cellular response produced by treatment of titanium surfaces by applying the cathodic polarization technique. **Data, sources, and selection.** The literature search was performed in several databases including PubMed, Web of Science, Scopus, Science Direct, Scielo and EBSCO Host, until June 2016, with no limits used. Eligibility criteria were used and quality assessment was performed following slightly modified ARRIVE and SYRCLE guidelines for cellular studies and animal research.

Results. Thirteen studies accomplished the inclusion criteria and were considered in the review. The quality of reporting studies in animal models was low and for the *in vitro* studies it was high. The *in vitro* and *in vivo* results reported that the use of cathodic polarization promoted hydride surfaces, effective deposition, and adhesion of the coated biomolecules. In the experimental groups that used the electrochemical method, cellular viability, proliferation, adhesion, differentiation, or bone growth were better or comparable with the control groups. **Conclusions.** The use of the cathodic polarization method to modify titanium surfaces seems to be an interesting method that could produce active layers and consequently enhance cellular response, *in vitro* and *in vivo* animal model studies.

Keywords. Cathodic polarization, electrochemical methods, medical titanium, cellular response, osseointegration, animal model

Introduction

The use of dental implants has increased in the last decades and they are currently widely used to provide good clinical results and high survival rates of 94.4% [1, 2]. Titanium-based materials are employed for medical purposes in implants for plastic and reconstructive surgeries and orthopaedic and craniofacial reconstructions, and also in dental implantology [3].

Titanium is a highly biocompatible material, showing adequate mechanical properties, chemical stability and corrosion resistance[4]. The biocompatibility of titanium implants is attributed to the stable oxide layer[3], and together with their

excellent mechanical characteristics, allow satisfactory tissue reaction, bone matrix formation, and low immune responses[1]. Even though they have a wide spectrum of advantages implant can fail, especially in patients with poor bone remnants, poor wound healing, or the presence of systemic problems such as osteoporosis and diabetes, which could reduce cellular response [5].

In order to improve the biological activity of the titanium surfaces and to promote better osteointegration and bone healing, modifications on the titanium implant surface are being used and tested, trying to preserve the titanium mechanical properties and bioinertness [6]. Electrochemical treatment is one of the surface treatments that have been indicated to be relatively simple and cheap, capable of maintaining titanium's mechanical properties and enhancing cellular responses [6]. Anodic polarization is the electrochemical treatment widely used to deposit molecules on the surfaces, showing the improved biocompatibility of titanium due to the increasing roughness and the oxide layer of the titanium surface [7]. Cathodic polarization is an alternative of electrochemical treatment that has recently been more investigated [6]. This electrochemical treatment is a method that has been reported as a simpler method that does not need higher temperatures to be performed and can activate titanium surfaces promoting roughness and depositing biomolecules [8]. The cathodic process could produce hydride layers, turning the possible charging of biomolecules [9], including the hydroxyapatite formation, with its capability of inducing a calcium phosphate formation in supersaturated aqueous solutions [10]. Even though the cathodic electrochemical option seems to be an interesting and simplified method to modify titanium surfaces that could enhance cellular activity and bone deposition, the literature is limited and is not consistent regarding the cellular responses.

The purpose of the present review was to systematically analyze systematically the existing studies that used the cathodic polarization technique to modify titanium surfaces to produce biological active titanium surfaces in vitro and in vivo.

Methods

This systematic review followed the PRISMA statement and the ARRIVE statements for reporting animal researches.

Our research question was formulated using the P.I.C.O. principle to determine if the use of cathodic polarization can produce biologically active medical titanium

surfaces in terms of cellular response (proliferation, adhesion, or differentiation) *in vitro* (cells) or *in vivo* (animal model).

Search Strategy

The search was conducted in PubMed, Web of Science, Scopus, Science Direct, Scielo and EBSCOHost databases until June 2016. Google Scholar and doctoral theses related to the research questions were also searched and reviewed. No restrictions on publication data or languages were used.

Mesh terms, commonly used terms, and synonyms were included as part of the search. An extensive combination of keywords was performed, and in order to include all the studies of interest [11], final keywords used included the following terms: (*"dental implants" OR implants, dental OR dental implant OR medical implants OR implants OR prostheses, surgical OR dental prosthesis, surgical OR surgical prostheses OR surgical dental prosthesis OR prostheses, surgical dental OR prosthesis, surgical dental OR discs*) AND titanium AND (*cathodic polarization OR hydride formation OR "surface deposition" OR "surface modification" OR "surface treatment"*)

The sequence of the keywords were adapted according to databases requirements, for instance the Web of Science included "TS=" at the beginning of each item.

Search results were uploaded to EndNote software (version 7.0, Thompson Reuters, 1988-2013) to facilitate and standardized the literature revision and analysis.

Study Selection

Inclusion criteria

Studies that used medical pure titanium or titanium implants modified by the cathodic polarization treatment, at least in one group, were included. Cathodic polarization method was considered when it was used the experimental titanium as working electrode (cathode) and a platinum electrode as anode, an acidic electrolyte solution, a controlled current density, a controlled temperature, a controlled time and galvanostatic technique.

Biological response, including cellular proliferation, adhesion, and differentiation; by *in vitro* cellular essays, animal models, or human clinical trials had to be tested to be included in our sample.

Exclusion criteria

Researches that evaluated titanium alloys, other material types different from titanium and orthodontic titanium appliances by mechanical or physical tests were excluded. Studies without control groups were also excluded. Modifications of the cathodic polarization standard method, literature reviews, patents, comments, editor letters, abstracts, or posters presentations were also excluded.

Selecting method

The selection was performed by two reviewers (MMSS and JCBA) independently and in duplicate, using the same eligibility criteria. The training and calibration process was performed prior to the formal literature analysis. For title and abstract analysis, inter-rater kappa values ranged from 0.88 to 0.93 and from 0.91 to 0.97 respectively. The selection was carried out in four stages. In a first stage, duplicated records were excluded and the titles of the remaining studies were screened to identify studies related to our research question. In the second stage, abstracts were read to localize and include studies that fulfilled the selection criteria. In the third stage, the full text was read and in the fourth stage the quality assessment was done. Differences in data extraction between the reviewers were discussed and consensus was reached.

Crosschecked bibliographies of the eligible papers for additional references were reviewed according to the eligibility criteria, and newfound studies were added if accomplished the eligibility criteria.

Data extraction

Data extracted were sample size; material, design and diameters of the titanium specimens; pre-treatment; studied groups; coating molecule; deposition methods used, characteristics of the cellular essay and/or animal models, cellular responses (proliferation, adhesion, and differentiation) or bone deposition as primary outcome,

other mechanical or physical characterization performed, statistical analysis, and other results. Standard deviation and means were also extracted if reported.

Pre-defined data-collection worksheets were employed for the assessment of the collected records and for each selected publication. Data was organized in tables and categorized to be analyzed for systematic synthesis. Descriptive analysis (absolute and relative numbers) were performed using the software STATA 12.0 (StataCorp, College Station, TX, USA).

Quality assessment

Each study was evaluated according to ARRIVE and SYRCLE statements for animal model studies. The ARRIVE criteria was modified to assess the quality of the *in vitro* studies.

ARRIVE guidelines for reporting *in vivo* experiments in animal research present a checklist of 20 items to evaluate and have been developed using the CONSORT statement as their foundation. The SYRCLE statement had 10 items and attempted to report if the studies were low bias, high bias, or unclear bias.

Results

The initial search yielded 3,807 records. After the exclusion of duplicate records and the use of the eligibility criteria, 13 studies remained [9, 10, 12-23]. The identification of the papers and the selection process are presented in Fig1. The exclusion of the studies in the last selection phase was mainly due to the use of a modified version of cathodic polarization and the used of other methods different from cathodic polarization as main outcome. Detailed reasons for exclusion are presented in S1 Table. The thirteen studies that accomplished the full eligibility criteria were selected as final sample.

Fig 1. Flowchart information of the different phases of papers search and selection.

Sensitivity analysis

Quality criteria of the studies are described in Table 1. According to the arrive criteria, 20 items were evaluated in the animal model *in vivo* studies. The *in vivo* animal model studies presented high or unclear risk of bias. The studies did not report information regarding selection method, sampling and allocation process, randomization, animal allocation and hostelling, blinding and dropouts, or replacement of the animals. Control of any confounders was also not reported. Overall results from seven studies with animal model showed that information was unclear ($n=15(10.7\%)$) or partially reported ($n=41(29.3\%)$). The overall results of "No" (high risk) was 27 (21.0%), and "Yes"(low risk) was 57 (40.7%).

Only 16 items from the ARRIVE criteria fit in the *in vitro* studies and could be evaluated. According to the criteria, *in vitro* cellular model studies showed medium bias. Studies presented incomplete ($n=9(10.7\%)$) or unclear information ($n=9(10.7\%)$). Information that accomplish "Yes" (low risk) criteria was 55 (65.5%) and "No" was 11 (13.1%) in the overall sample of *in vitro* studies.

Quantitative assessment according the ARRIVE criteria is presented in Table 2 and qualitative data are present in S1 Fig.

Data Obtained

All studies used pure titanium-grade 2 or 4 (100.0%). Pure titanium and also titanium alloys were used in two studies (15.4%).Titanium shapes were used in the studies in the form of coins (53.9%), sheets (15.4%), implants (23.1%), and bars (7.7%).

To increase the surface energy, eleven studies (84.6%) prepared the experimental titanium surfaces by grinding, polishing, etching, washing, and drying [9, 10, 13, 15-20, 22, 23]. Cathodic polarization technique was similar in all studies. It was used platinum as anode, the titanium sample as cathode and the control electrode was calomel (SCE) or silver. The technique included in all cases, the use of acidic solutions as a conduction medium.

The main results of the studies are presented in table 3. Cathodic polarization was mainly used to coat biomolecules in eight [9, 10, 12, 15, 16, 18, 21, 22] studies (61.6%) three studies (23.1%) used the cathodic polarization for hydration of the titanium surfaces [17, 19, 23], and two studies (15.4%) used acid electrolytes[13, 20].

The deposited biomolecules included calcium phosphate derivate in five studies (38.5%), such as hydroxyapatite and brushite. Other molecules such as enamel matrix derivate, Magnesium, Strontium were also used in three studies (23.1%). Acids such as Pyrrole-3-acetic modified, oxalic acetic or tartaric acids were used to promote surface modifications in five investigations (38.5%).

Titanium characterization was performed in all studies. The tests included surface morphology by scanning electron microscopy (SEM) or transmission electron microscopy (TEM); surface chemistry by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) or secondary ion mass spectrometry (SIMS), blue light laser profilometer, UV-vis spectroscopy, field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), X-ray diffraction, and contact angle measurement.

Biocompatibility and cellular response tests performed were cytotoxicity, cell proliferation, adhesion and differentiation, cell morphology observation, and RNA isolation-reverse transcriptase (RT)-PCR amplification. For bone growth assessment, Rx and bone mineral density, micro-computed tomography (Micro-CT), confocal laser microscopy, osseointegration histological analysis, and pull-out tests were conducted.

Studies performed *in vitro* cellular tests (46.2%), six studies opted by the *in vivo* animal model (46.2%) and one study (7.7%) was performed *in vitro* and *in vivo* essay. The cellular types used were MC3T3-E1 osteoblast-like cells (71.4%), human gingival fibroblast (14.3%), NIH3T3, and fibroblasts (14.3%).

Studies showed that the cathodic polarization method promoted incorporation of the biomolecules, such as phosphate hydroxyapatite derivate, antibiotics, and enamel matrix derivate, on the titanium surfaces.

In vitro cellular tests showed significantly higher cellular proliferation [13, 16, 20] or adhesion [13, 15, 19] after 3-7 days in the experimental (hydrided or coated) groups than in control groups. Cytotoxicity was similar in all groups [20] and gene expression of Coll-1 mRNA and alkaline phosphatase was increased in the coating groups compared to the control groups [9].

In vivo animal model studies reported no toxic effect enhancement on bone formation [12, 18, 22], showing balance in gene expression between some biological factors such as osteocalcin, collagen-I or TRAP [23], and bone retention [17] in the groups of titanium hydrided or with biomolecule coatings [10, 21] compared to control groups after 3-12 weeks of experiment.

Discussion

To the best of our knowledge, this review is the first to systematically collect the existing evidence in relation to the cell response to the titanium surfaces modified by the cathodic polarization technique

Indeed, there are several different techniques of deposition to modify medical titanium surfaces including plasma, sputter-deposition, sol–gel coatings, electrochemical deposition, or biomimetic precipitation. Plasma-spraying is widely used [24], as well as the anodic method to coat molecules. Even though there are advantages of these last two techniques, they present some drawbacks, such as low adhesion and thicker coating, respectively. These problems were attributed to technique issues produced essentially by the temperature used.

Electrodeposition using titanium as a cathode is usually conducted in acidic electrolytes, organic or inorganic, in order to modify surfaces of titanium for hydridation or deposition of molecules. The techniques make it possible to control the thickness of the coating deposit on all kinds of surfaces and reduce the time required for coating, as the process is highly reproducible and efficient[12].

Results from our included studies indicated that the use of the cathodic polarization as surface treatment in acid solutions induced the hydride layers' formation on titanium, increasing positive cellular responses regarding proliferation, adhesion, and differentiation [17, 22, 23]. Other studies that used this technique reported the reduction of the mechanical properties of titanium due to hydrogen embrittlement produced by the hydride layers, which could possible cause implant fractures [25, 26]. Recent studies showed that the presence of the hydride layer obtained using cathodic polarization offers the potential for attaching biomolecules, such as antibiotics and hydroxyapatites in ambient temperatures, on pure titanium, titanium alloys [9], or other metal types. In fact, this has been the main advantage of the cathodic polarization so far [12].

In the present review, most of the investigation have deposited biomolecules on titanium and they observed positive deposition in terms of integrity, adhesion and thickness, also detecting enhanced cell adhesion. Biomolecules deposited on the surface were observed to maintain their integrity, presenting good interaction with the metal surface and having binding strength [18]. The layers generated were mostly thin (100um min) but dense enough to promote good strength of the coatings [10].

Bioactive molecules can be adsorbed, affecting cell attachment to the surface and tissue response. Several molecules could be deposited to improve titanium surfaces in terms of biological responses such as magnesium, strontium, or bone proteins [9, 21, 27]. For instance, the electrochemical deposition of calcium-phosphate-derivate molecules can increase fixation of implants to bone tissue, promoting better adhesion and activation of bone cells on the implant surfaces [12]. Another advantage is the possibility to deposit drugs on the active surfaces, which could be released over a period of time, enhancing the cellular responses [28].

Some factors related to the method of the cathodic technique deposition can influence the film characteristics and consequently cellular response [6]. In this review, the eligibility criteria attempted to include studies presenting similar characteristics regarding the cathodic method used.

Most of the studies used room temperatures to performed the test in the range of 20°C to 25°C. The technique of deposition is performed at ambient temperatures, being that such characteristics are probably responsible for the good conformability to the shape of the molecules' components on titanium surfaces, the thickness of the films (less than 1 μm), and the increased resistance to delamination for the coating homogeneity and the stronger adhesion of the coating[6]. Lower temperatures during deposition of the film can decrease the presence of defects or pores on hidroxyapatite crystals [29].

Cathodic polarization in acid can optimize titanium implant surfaces for improved osseointegration. In the present review, most of the studies opted to use electrolytes with lower pH (2-6). It was reported that baths with pH of 4.11 produce the deposition of hydroxyapatite films on titanium alloy [30]. Studies have observed that increasing the pH to 5 [31]or nearly neutral (7.2)[32] produce mono grain phases. Hydrofluoric acid has been shown to increase the hydride and fluoride amount on Ti surfaces, changing the porosity of the surface and consequently the surface roughness [20]. These alterations were positively correlated within vivo bone retention and peri-implant bone mineralization [17]

Cell adhesion, growth, and biocompatibility between osteoblast-like cells and treated surfaces have increased, preserving osteoblastic phenotype [13]. The expression of proteins such as Coll-1 mRNA and alkaline phosphatase activity indicated the bone proliferation activity promoted by the modified surface [9].

The current density is another factor that can influence the films in relation to mechanical, physical and biological characteristics. In our review, studies used current densities in the range of 0.4-20mA/cm² or -2.0 -2.5V during 30 to 60 minutes. The density current determinates the format and the adhesion of the deposit. It has been shown that decreasing the current density produced deposits with needle forms and increasing it can produce blunt forms of the particles of hydroxiapatite [33]. When associate with lower pH and/or with stirrings - ultrasonic or magnetic- the size of the particle could be reduced. The size of the particle is also important since smaller particles were found to enhance the cellular adhesion on the surface [30]. On the other hand, lower current densities in the range of 0.2-15mA/cm² increased bond strengths of the coating [34].

In our study, the sample was composed of investigation using galvanostatic technique. The galvanostatic technique allowed to work in acid or near physiological pH at body temperature and doesn't require post-treatment, which is required in the pulse electrochemical method where a post-treatment at high temperatures in the range of 300°C-800°C is needed. Higher temperatures could negatively have affected the mechanical properties of the coated surface as aforementioned.

The studies included were composed of in vitro cellular essays and in vivo animal model experiments that used cathodic polarization method to modified titanium surfaces. In vitro results reported significant higher cellular proliferation, gene expression of bone formation genes and low cytotoxicity. Animal experiments reported no toxic effect, enhancement of bone formation and bone retention in the groups with modified surface of titanium by the cathodic technique. In fact, all the studies with animal models were performed after an in vitro essay. For instance, in vitro observation of titanium surfaces showed needle-like carbonate apatite, this new composite enhance the mechanical bonding strength in early stages of implantation in the animal model, increasing the filling of the gap between the implant and the surface with new bone compared to those without the treatment [12]. The surface modifications, in macro and micro level can efficiently increase biological events in vitro and in vivo [8]. In the study of Young-Taeg et al., 2009 [21], the treatments performed on titanium modified the topographies regarding the roughness and also produce chemistry changes on surfaces. These changes were associated with improvement of osseointegration since the oxidized groups by cathodic polarization presented better stability and bone density [21]. The author also sustained that when

implants stability in early stages is low, subsequent resonance values increased rapidly over the time, possibly due to difference in bone properties between the animals and humans [21].

The hydrophilicity is an important factor in the enhancement of the bone response [6, 8, 24]. Hydrophilicity was demonstrated to increased osseointegration when using in vitro and in vivo animal models [35]. This situation was also detected by Lamolle et al., 2009, where a positive correlation was found between high bone retention and high amounts of Fluoride and the hydride in the surface in the group with lower concentration of electrolyte. The author explained that this could be due to the aggressive conditions produced by the high electrolyte concentration, once at low hydrofluoric acid concentrations the surfaces were weakly etched, and consequently, kept higher amounts of fluoride, oxide, and hydride. Also a correlation was observed between some roughness parameters regarding positive surface skewness that means elevations on flat surfaces, kurtosis higher than 3 that is rounded peaks and high core fluid retention (more spaces between the peaks) with high bone retention of implants. Studies showed the importance of the roughness and its relation with higher bond strength [36] and the before mention study showed that a conjunct of surface parameters can predict the in vivo performance of bone retention [17].

It is clear that in vitro controlled methods allowed to obtain more objective results, nevertheless is difficult to extrapolated such findings directly to the in vivo animal models, since several factors cannot be controlled in animal experimentation as opposite to the the in vitro condition[37]. The strengths of the animal experiments include the possibility of learning about some biological mechanism in an living organism, turning their results more representative to the clinical situation than those obtained in vitro [38].

It was suggested that systematic reviews and meta-analyses on animal experiments can be conducted in order to model relevant clinical problems since some treatments are currently being offered to vulnerable groups of patients without much evidence of their beneficial effects [39, 40].

Some limitations should be considered. We did not find any in vivo clinical trials using prosthetic appliances obtained by cathodic polarization, making the clinical effect of this technique unclear. Additionally, systematic reviews including animal experiments or cellular responses are different situations from the in vivo clinical reality; however, it allows a more objective appraisal of the research evidence from

the traditional narrative reviews, and also offer a sensible and rational approach to assessing the translational potential of promising experimental interventions before decisions are made to proceed with clinical trials [39, 40].

Our findings should be considered with caution, since according to the ARRIVE quality criteria the studies with animal experiments showed medium or high risk of bias due to the incomplete or lack of data reported. It has been discussed the importance to report information such as the study design, animal characteristics, housing and husbandry, allocation of the animal, eventual exclusions or adverse events in the studies with animal models, which could influence the results, especially when is testing new medicines or drugs[38, 41].

However, since there is no evidence testing titanium surfaces modified by cathodic polarization in human clinical trials, the results obtained from our sample of studies using animal experiments can generate contribution firstable with the necessity and importance of a good quality reporting of results when an animal model study is performed, and second, because of the clear necessity of more evidence using animal model before thinking in human clinical trials.

This systematic review showed that the use of cathodic polarization produced adequate cellular response promoting proliferation, differentiation, and bone development in vitro and in animal experiments. The cathodic polarization seems to be a feasible alternative to successfully modified surfaces, maintaining adequate mechanical and biologic properties, allowing deposit of biomolecules and promoting activity on the surface by hydrided formation.

Conclusion

Cathodic polarization promotes titanium surface modifications, increasing the adhesion of active biomolecules and hydridation of titanium surfaces. Modified surfaces enhance cellular response in vitro and in vivo-animal models.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq- process 482251/2013-1).

Jose Carlos Bernedo Alcázar, Mabel Miluska Suca Salas, Marcus Cristian Muniz Conde, Luiz Alexandre Chisini, Flávio Fernando Demarco, Sandra Beatriz Chaves Tarquinio, and Neftali Lenin Villarreal Carreño analyzed the data, wrote the first draft of the paper, and contributed to the writing of the paper.

References

1. Van Velzen FJ, Ofec R, Schulten EA, Ten Bruggenkate CM. 10-year survival rate and the incidence of peri-implant disease of 374 titanium dental implants with a SLA surface: a prospective cohort study in 177 fully and partially edentulous patients. *Clinical oral implants research*. 2014. Epub 2014/11/06. doi: 10.1111/clr.12499. PubMed PMID: 25370914.
2. Becker ST, Beck-Broichsitter BE, Rossmann CM, Behrens E, Jochens A, Wiltfang J. Long-term Survival of Straumann Dental Implants with TPS Surfaces: A Retrospective Study with a Follow-up of 12 to 23 Years. *Clinical implant dentistry and related research*. 2015. Epub 2015/03/27. doi: 10.1111/cid.12334. PubMed PMID: 25810237.
3. de Jonge L, Leeuwenburgh SG, Wolke JC, Jansen J. Organic–Inorganic Surface Modifications for Titanium Implant Surfaces. *Pharm Res*. 2008;25(10):2357-69. doi: 10.1007/s11095-008-9617-0.
4. Niinomi M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2008;1(1):30-42. Epub 2008/01/01. doi: 10.1016/j.jmbbm.2007.07.001. PubMed PMID: 19627769.
5. Herrmann I, Lekholm U, Holm S, Kultje C. Evaluation of patient and implant characteristics as potential prognostic factors for oral implant failures. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2005;20(2):220-30. Epub 2005/04/21. PubMed PMID: 15839115.
6. Kim K-H, Ramaswamy N. Electrochemical surface modification of titanium in dentistry. *Dental materials journal*. 2009;28(1):20-36. doi: 10.4012/dmj.28.20.
7. Cheng H-C, Lee S-Y, Chen C-C, Shyng Y-C, Ou K-L. Titanium nanostructural surface processing for improved biocompatibility. *Applied Physics Letters*. 2006;89(17). doi: 10.1063/1.2361279. PubMed PMID: WOS:000241585800138.
8. Pachauri P, Bathala LR, Sangur R. Techniques for dental implant nanosurface modifications. *The journal of advanced prosthodontics*. 2014;6(6):498-504. Epub 2015/01/06. doi: 10.4047/jap.2014.6.6.498. PubMed PMID: 25558347; PubMed Central PMCID: PMC4279049.

9. Frank MJ, Walter MS, Rubert M, Thiede B, Monjo M, Reseland JE, et al. Cathodic Polarization Coats Titanium Based Implant Materials with Enamel Matrix Derivate (EMD). *Materials*. 2014;7(3):2210-28. doi: 10.3390/ma7032210. PubMed PMID: WOS:000336089500040.
10. Zhang Q, Leng Y, Lu X, Xin R, Yang X, Chen J. Bioactive films on metallic surfaces for osteoconduction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009;88A(2):481-90. doi: 10.1002/jbm.a.31820. PubMed PMID: WOS:000262228300023.
11. Khan KS, Kunz R. Five steps to conducting a systematic review. 2003;96(3):118-21. PubMed PMID: 12612111; PubMed Central PMCID: PMC PMC539417.
12. Ban S, Maruno S, Arimoto N, Harada A, Hasegawa J. Effect of electrochemically deposited apatite coating on bonding of bone to the HA-G-Ti composite and titanium. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997;36(1):9-15. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199707)36:1<9::aid-jbm2>3.0.co;2-p. PubMed PMID: WOS:A1997XG35400002.
13. De Giglio E, Cometa S, Calvano CD, Sabbatini L, Zambonin PG, Colucci S, et al. A new titanium biofunctionalized interface based on poly(pyrrole-3-acetic acid) coating: proliferation of osteoblast-like cells and future perspectives. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2007;18(9):1781-9. Epub 2007/05/08. doi: 10.1007/s10856-007-3037-2. PubMed PMID: 17483896.
14. Gomez-Florit M, Xing R, Ramis JM, Taxt-Lamolle S, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, et al. Human gingival fibroblasts function is stimulated on machined hydrided titanium zirconium dental implants. *Journal of dentistry*. 2014;42(1):30-8. doi: 10.1016/j.jdent.2013.11.003. PubMed PMID: WOS:000328689200005.
15. Hosaka M, Shibata Y, Miyazaki T. Preliminary beta-tricalcium phosphate coating prepared by discharging in a modified body fluid enhances collagen immobilization onto titanium. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*. 2006;78B(2):237-42. doi: 10.1002/jbm.b.30478. PubMed PMID: WOS:000239300000004.

16. Huang Y, Han S, Pang X, Ding Q, Yan Y. Electrodeposition of porous hydroxyapatite/calcium silicate composite coating on titanium for biomedical applications. *Applied Surface Science*. 2013;271(0):299-302. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.01.187>.
17. Lamolle SF, Monjo M, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haugen HJ. Titanium implant surface modification by cathodic reduction in hydrofluoric acid: surface characterization and in vivo performance. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2009;88(3):581-8. Epub 2008/02/29. doi: 10.1002/jbm.a.31898. PubMed PMID: 18306318.
18. Liang Y, Li H, Xu J, Li X, Qi M, Hu M. Morphology, composition, and bioactivity of strontium-doped brushite coatings deposited on titanium implants via electrochemical deposition. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):9952-62. Epub 2014/06/06. doi: 10.3390/ijms15069952. PubMed PMID: 24901526; PubMed Central PMCID: PMC4100132.
19. Ou K-L, Lin C-T, Chen S-L, Huang C-F, Cheng H-C, Yeh Y-M, et al. Effect of multi-nano-titania film on proliferation and differentiation of mouse fibroblast cell on titanium. *Journal of the Electrochemical Society*. 2008;155(6):E79-E84. doi: 10.1149/1.2907159. PubMed PMID: WOS:000255524100043.
20. Xing R, Salou L, Taxt-Lamolle S, Reseland JE, Lyngstadaas SP, Haugen HJ. Surface hydride on titanium by cathodic polarization promotes human gingival fibroblast growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(5):1389-98. doi: 10.1002/jbm.a.34819. PubMed PMID: WOS:000333215600019.
21. Young-Taeg S, Jönsson J, Goui-Seong Y, Johansson C. Resonance frequency measurements in vivo and related surface properties of magnesium-incorporated, micropatterned and magnesium-incorporated TiUnite®, Osseotite®, SLA® and TiOblast® implants. *Clinical Oral Implants Research*. 2009;20(10):1146-55. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01767.x. PubMed PMID: 44119384.
22. Tao Z-S, Zhou W-S, He X-W, Liu W, Bai B-L, Zhou Q, et al. A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats. *Materials science & engineering C*,

Materials for biological applications. 2016;62:226-32. doi: 10.1016/j.msec.2016.01.034. PubMed PMID: 26952418.

23. Taxt-Lamolle SF, Rubert M, Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Monjo M. Controlled electro-implementation of fluoride in titanium implant surfaces enhances cortical bone formation and mineralization. *Acta biomaterialia*. 2010;6(3):1025-32. Epub 2009/09/26. doi: 10.1016/j.actbio.2009.09.014. PubMed PMID: 19778643.

24. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*. 2007;23(7):844-54. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.025>.

25. Frank MJ, Walter MS, Bucko MM, Pamula E, Lyngstadaas SP, Haugen HJ. Polarization of modified titanium and titanium-zirconium creates nano-structures while hydride formation is modulated. *Applied Surface Science*. 2013;282:7-16. doi: 10.1016/j.apsusc.2013.04.059. PubMed PMID: WOS:000322314800002.

26. Yokoyama Ki, Ichikawa T, Murakami H, Miyamoto Y, Asaoka K. Fracture mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implant. *Biomaterials*. 2002;23(12):2459-65. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00380-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00380-5).

27. Walter MS, Frank MJ, Satue M, Monjo M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, et al. Bioactive implant surface with electrochemically bound doxycycline promotes bone formation markers in vitro and in vivo. *Dental Materials*. 2014;30(2):200-14. doi: 10.1016/j.dental.2013.11.006. PubMed PMID: WOS:000329945600014.

28. Alghamdi HS, Jansen JA. Bone regeneration associated with nontherapeutic and therapeutic surface coatings for dental implants in osteoporosis. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2013;19(3):233-53. Epub 2012/10/24. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0400. PubMed PMID: 23088597.

29. Prado Da Silva MH, Soares GD, Elias CN, Best SM, Gibson IR, DiSilvio L, et al. In vitro cellular response to titanium electrochemically coated with hydroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2003;14(6):511-9. Epub 2004/09/07. PubMed PMID: 15348435.

30. Narayanan R, Seshadri SK, Kwon TY, Kim KH. Electrochemical nano-grained calcium phosphate coatings on Ti-6Al-4V for biomaterial applications. *Scripta Materialia*. 2007;56(3):229-32. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scriptamat.2006.10.004>.
31. Shirkhanzadeh M. Direct formation of nanophase hydroxyapatite on cathodically polarized electrodes. *Journal of materials science Materials in medicine*. 1998;9(2):67-72. Epub 2004/09/07. PubMed PMID: 15348909.
32. Peng P, Kumar S, Voelcker NH, Szili E, Smart RSC, Griesser HJ. Thin calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition in modified simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006;76A(2):347-55. doi: 10.1002/jbm.a.30514.
33. Narayanan R, Kwon TY, Kim KH. Preparation and characteristics of nano-grained calcium phosphate coatings on titanium from ultrasonated bath at acidic pH. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2008;85(1):231-9. Epub 2007/09/15. doi: 10.1002/jbm.b.30941. PubMed PMID: 17854064.
34. Ma M, Ye W, Wang X-X. Effect of supersaturation on the morphology of hydroxyapatite crystals deposited by electrochemical deposition on titanium. *Materials Letters*. 2008;62(23):3875-7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2008.05.009>.
35. Yeo IS. Reality of dental implant surface modification: a short literature review. *The open biomedical engineering journal*. 2014;8:114-9. Epub 2014/11/18. doi: 10.2174/1874120701408010114. PubMed PMID: 25400716; PubMed Central PMCID: PMC4231373.
36. Chen GF, Wen XJ, Zhang N. Corrosion resistance and ion dissolution of titanium with different surface microroughness. *Bio-medical materials and engineering*. 1998;8(2):61-74. PubMed PMID: WOS:000076917700002.
37. Gasik M, Braem A, Chaudhari A, Duyck J, Vleugels J. Titanium implants with modified surfaces: Meta-analysis of in vivo osteointegration. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;49:152-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.074>.

38. Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ (Clinical research ed)*. 2007;334(7586):197. Epub 2006/12/19. doi: 10.1136/bmj.39048.407928.BE. PubMed PMID: 17175568; PubMed Central PMCID: PMCPmc1781970.
39. Stadlinger B, Pourmand P, Locher MC, Schulz MC. Systematic review of animal models for the study of implant integration, assessing the influence of material, surface and design. *Journal of clinical periodontology*. 2012;39 Suppl 12:28-36. Epub 2012/05/02. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01835.x. PubMed PMID: 22533945.
40. Mueller KF, Briel M, Strech D, Meerpohl JJ, Lang B, Motschall E, et al. Dissemination bias in systematic reviews of animal research: a systematic review. *PloS one*. 2014;9(12):e116016. Epub 2014/12/30. doi: 10.1371/journal.pone.0116016. PubMed PMID: 25541734; PubMed Central PMCID: PMCPmc4277453.
41. Peters JL, Sutton AJ, Jones DR, Rushton L, Abrams KR. A systematic review of systematic reviews and meta-analyses of animal experiments with guidelines for reporting. *Journal of environmental science and health Part B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*. 2006;41(7):1245-58. Epub 2006/08/23. doi: 10.1080/10934520600655507. PubMed PMID: 16923604.

Supporting Information

S1 Table. Excluded studies and reasons for exclusion

S1 Fig. Figure presenting the quantitative results means of the ARRIVE criteria for in vitro and animal model studies.

Table 1. Quality assessment according to ARRIVE and SYRCLE criteria.

Quality Criteria statements		Authors													
SYRCLE (Bias)	ARRIVE statements	Tao et al., 2016	Liang et al., 2014	Lamolle et al., 2010	Lamolle et al., 2009	Zhang et al., 2009	Young-Taeg et al., 2009	Ban et al., 1996	Frank et al., 2014	Xing et al., 2014	Huang et al., 2013	Ou et al., 2008	De Giglio et al., 2007	Hosaka et al., 2006	
		AM	AM and CM	AM	AM	AM	AM	AM	CM	CM	CM	CM	CM	CM	
Selection Detection Performance/ detection	1 TITLE*	3	1	1	1	3	1	1	1	1	1	3	1	1	
	2 ABSTRACT	1	3	1	1	3	3	3	1	1	3	3	1	1	
	Summary of the background, research objectives*	1	1	3	3	1	3	0	1	1	0	0	1	1	
	Details of the species or strain of animal used	1	0	1	1	0	3	1	4	4	4	4	4	4	
	Key methods, principal findings and conclusions *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	
	3 INTRODUCTION	1	1	3	3	1	1	3	1	1	1	1	3	1	1
	Background information *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Experimental approach *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1
	Relevance to human biology*	1	1	2	0	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
	4 Objectives *	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1
	METHODS														
	5 Ethical statement/ guidelines for animals care/used	1	1	1	1	2	1	1	1	4	4	4	4	4	4
	6 Study design*	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Experimental and control groups*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1
	Allocation samples*	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Randomization samples*	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Blinding (Researchers, caregivers, assessors)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7 Experimental procedure	3	1	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1
	in vitro cellular detail method*	4	1	4	4	4	4	4	4	1	1	1	1	1	1
	Specimens characteristics and preparations *	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
	Coating procedures*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Anesthesia	0	1	0	0	1	1	0	4	4	4	4	4	4	4
	Antibiotics	0	1	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4
	Analgesia	0	1	0	0	0	1	0	4	4	4	4	4	4	4
	Surgical procedure	1	1	1	1	1	1	1	4	4	4	4	4	4	4

Selection	8 Experimental animals	3	3	1	1	3	3	3	4	4	4	4	4	4
	Species	1	1	1	1	1	1	1	4	4	4	4	4	4
	strain, sex, developmental stage, weight	1	1	1	1	1	1	3	4	4	4	4	4	4
	source of animals	0	0	1	1	0	0	0	4	4	4	4	4	4
Performance	9 Housing and husbandry	1	3	1	3	0	0	3	4	4	4	4	4	4
	Housing and husbandry – conditions and welfare-	1	0	1	1	0	3	0	4	4	4	4	4	4
	Related assessments and interventions	1	1	1	0	0	0	1	4	4	4	4	4	4
	10 Sample size* –	3	3	3	3	2	0	2	0	3	0	0	0	0
	Sample size* –	1	1	1	1	2	0	2	0	1	0	0	0	0
	Sample size calculation*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Number of animals in each experimental group	1	2	1	2	2	0	0	4	4	4	4	4	4
	Number of samples in each experimental group*	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	2
	Allocation animals	3	0	3	0	2	0	0						
	Allocation animals to experimental groups	1	0	1	0	1	0	0	4	4	4	4	4	4
	Randomization or matching	1	0	1	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
	Order in which animals were treated and assessed	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
	12 Experimental outcomes –primary and secondary *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	13 Statistical methods* – details and unit of analysis RESULTS	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1
Attrition	14 Baseline data – characteristics /health status of animals	1	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
Attrition	15 Numbers analyzed –	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1
	Absolute numbers in each group included in each analysis*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Other	Explanation for exclusion	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
Reporting	16 Outcomes and estimation – results for each analysis with a measure of precision*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Other	17 Adverse events – details and modifications for reduction DISCUSSION	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
	18 Interpretation	3	2	2	2	3	3	2	3	1	3	3	1	3
	scientific implications*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Study limitations* , bias, limitations of animal model	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
	Implications/ n animal reduction	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4

19	Generalisability/translation/ relevance to human biology*	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
20	Funding *	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1

*Items assess also for *in vitro* cellular tests 0=No (high risk of bias), 1=Yes (low risk of bias) 2=Unclear (unclear risk of bias) 3= partial reported 4= not applicable; AM=animal model CM=cellular model

Table 2. Quantitative results of ARRIVE according to the 20 evaluated items

Variables/Category	No(high)		Yes(low)		Unclear		Partial report		Total	Risk bias
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)		
1. Tao et al., 2016	3	15.5	9	45.0	1	5.0	7	35.0	20	Unclear/high
2. Liang et al., 2014	4	20.0	9	45.0	2	10.0	5	25.0	20	Unclear/high
3. Lamolle et al., 2010	3	15.0	10	50.0	2	10.0	5	25.0	20	Medium
4. Lamolle et al., 2009	4	20.0	9	45.0	2	10.0	5	25.0	20	Unclear/high
5. Zhang et al., 2009	4	20.0	5	25.0	4	20.0	7	35.0	20	High
6. Young-Taeg et al., 2009	5	25.0	9	45.0	1	5.0	5	25.0	20	Unclear/high
7. Ban et al., 1997	4	20.0	6	30.0	3	15.0	7	35.0	20	High
8. Frank et al., 2014*	2	14.3	10	71.4	1	7.1	1	7.1	14	Medium
9. Xing et al., 2014*	2	14.3	10	71.4	1	7.1	1	7.1	14	Medium
10. Huang et al., 2013*	2	14.3	9	64.3	1	7.1	2	14.3	14	Medium
11. Ou et al., 2008*	1	7.1	6	42.9	3	21.4	4	28.6	14	Unclear/high
12. De Giglio et al., 2007*	2	14.3	10	71.4	2	14.3	-	-	14	Medium
13. Hosaka et al., 2006*	2	14.3	10	71.4	1	7.1	1	7.1	14	Medium

*in vitro cellular test

Table 3. Surface properties and cellular responses from in vitro and in vivo-animal model studies

AUTORS	EXPERIMENTAL PROCEDURE	SURFACE CHEMISTRY AFTER TREATMENT	SURFACE MORPHOLOGY OR FILM COMPOSITION	STRENGTH RESISTANCE: PULL-OUT, REMOVAL TORQUE, STABILITY.	BONE GROWN /CELL ADHESION
IN VIVO-ANIMAL MODEL					
Ban et al. 1997	Hydroxyapatite (HA)deposition	Basic elements of Apatite were present on the titanium surface.	HA surface only had Spherical particles of HA. Surface with HA electrochemically coated is covered by needle-like precipitates.	Higher strength resistance from pull-out test was observed in the titanium treated by electrochemical methods than the control samples, after 3 and 6 weeks of implantation	The formation of new bone was enhanced in the electrochemical treated surface compared to the control surfaces.
Lamolle et al., 2009	Hydrofluoric acid (HF)	Hydride, Fluoride and Oxide were present.	The oxide concentration was higher in the 0.001% HF at 30nm. Low concentration of HF increased hydrophobicity.	Implants modified by cathodic reduction with 0.01 vol % hydrofluoric acid showed the highest pull out strength (p< 0.05) followed by the 0.1vol%.	The concentrations of the fluoride and hydride in the titanium implant modified surfaces was correlated to the in vivo bone retention(r=0.94).
Lamolle et al., 2010	Hydrofluoric acid (HF)	Hydride, Fluoride and Oxide were present.	Groups of implants with 0.001% and 0.01% HF showed the highest fluoride content at their surface structure	-	All experiment groups showed new peri-implant cortical bone, but implants treated with 0.01% HF showed higher osteocalcin, collagen-I and TRAP, revealing an advanced osseointegration process. Implants modified with 0.001% and 0.01% HF presented a statistically significant increased newly formed bone. Lower presence of blood was observed at the interface after removal of the implant in the groups of implants (0.001% and 0.01% HF). The control group scored higher LDH activity than all the test groups.
Liang et al., 2014	Pure brushite and modified brushite with 5%, 10%, and 20% Strontium (Sr) deposition	Basic elements of Brushite and Strontium were present on the titanium surface.	Brushite coating, presence of crystals, some arranged in clusters. Brushite coating containing 20% Sr showed an irregular surface morphology	Removal torque strength in 5% Sr and 10% Sr groups was significantly increased compared with the other three groups without cathodic treatment (p < 0.01)	After 24, 48, or 72h the number of the proliferating cells on the brushite-coated and Sr-doped brushite groups were higher than in the control group (p < 0.01), especially in the 10% Sr-doped coating. Modified surfaces with 5% and 10% Sr-doped brushite coatings were associated with increased 3D bone volume(p < 0.05), especially around the 10% Sr-doped brushite-coated implants.
Tao et al., 2016	Electrochemical deposition of Zinc(Zn), Strontium, Magnesium(Mg), and HA.	Coatings composed of hydroxyapatite containing 10% Zn, Mg and Sr ions on titanium.	-	Push-out force of group Sr-HA was significantly higher than that of groups Zn-HA and Mg-HA. Group Sr-HA showed the strongest effects on all micro-CT parameters (bone volume, trabecular thickness, connective density, trabecular number; trabecular separation) significantly (p<0.05).	After 12 weeks, new bone was formed. Within the circumference of marrow cavities of cortical bone, there were osteoblast-like cells, suggesting the beginning of new bone formation. There was more bone tissue on implant surfaces of Zn-HA, Mg-HA, Sr-HA-coated implants than in those of HA-coated.
Young et al.,2009	Electrochemical deposition of Magnesium, Phosphate	Magnesium, P, and Ti were identified in the composition.	The implants had moderate roughness of 0.7–1.4 mm. Oxidized implants had crystal structures consisting of a mixture of Anatase and rutile phase.	After 6 weeks of healing, all surfaces increased implant stability but it was higher in the modified surfaces than in the control surfaces.	New bone formation occurred in all surfaces, but it was increased in the Mg-MP implant group.

Zhang et al., 2009	Solution of calcium phosphates as medium	Titanium hydride was identified. Calcium and Phosphates were present on the titanium surface.	Metal surface were rough and had fine granular appearance. A thin layer of CaP (100nm thick) was deposited and had higher resistance to displacement.	-	Bone growth was fast in the electrochemical-treated specimens. After 4weeks bone formation and the amount of bone in electrochemical titanium and stainless steel samples were significantly higher than that in control without cathodic treatment ($p < 0.01$).
IN VITRO STUDIES					
Franck et al., 2014	Enamel Matrix Derivate (EMD) deposition	EMD was coated. Characteristic elements were identified in the composition.	Electrochemical EMD coated samples presented larger spherical structures attached to the surface. Sandblasted and acid-etched revealed nano-nodules and small spherical structures on the surface.	-	No cytotoxicity was observed in any group. For Electrochemical treated groups the expression of Coll-1 mRNA levels and the alkaline phosphatase activity was significantly higher compared to control.
Xing et al., 2014	Acids (oxalic : OA)as medium	Presence of Hydride. Characteristic elements were identified in the composition.	OA created the roughest surface and thin layers.	-	At day 3, cells grown in all groups faster than in the control. The proliferation rate on acetic acid was significantly higher than others groups. Hydrogen amount on the surfaces was correlated with proliferation rate at day 3 ($r = 0.973$, $p < 0.05$). At day 6, proliferation of cells was higher in tartaric and control groups only.
Huang et al., 2013	Hydroxyapatite (HA) deposition	Deposition of HA. HA surface was mainly composed of O, P, Ca, and Si. Si content was $7.77 \text{ wt.}\% \pm 0.39$.	HA and HA/CS films formed uniform layers on the Ti substrate. The HA/CS coating had a porous structure and the HA coating had a dense surface structure.	-	After 7 days, cell proliferation on the HA/Cathodic coated surfaces was higher ($p < 0.05$) than those on HA coating.
Ou et al., 2008	Electrochemical treatment	Promote the presence of Hydride. O_2 concentration following electrochemical treatment was higher than in polished Ti.	Titania film with cathodic pre-treatment and anodization was thicker than other groups Porosity was higher in ACTi samples	-	Cathodic pre-treatment followed by anodization at 24h significantly more cells attached than controls (cathodic and anodization treatment only). Cells on AC-Ti were more spread out and had more, longer filopods than other groups.
De Giglio et al., 2007	Pyrrole-3-acetic acid, 4-fluoro-phenylalanine deposition	Promote deposition of 4-fluoro-phenylalanine modified PPy-3-acetic film.			Cell Adhesion, growth, and viability of osteoblast-like cells onto PPy-3-acetic modified titanium substrates were comparable to the control groups. Cell phenotype was similar in all groups.

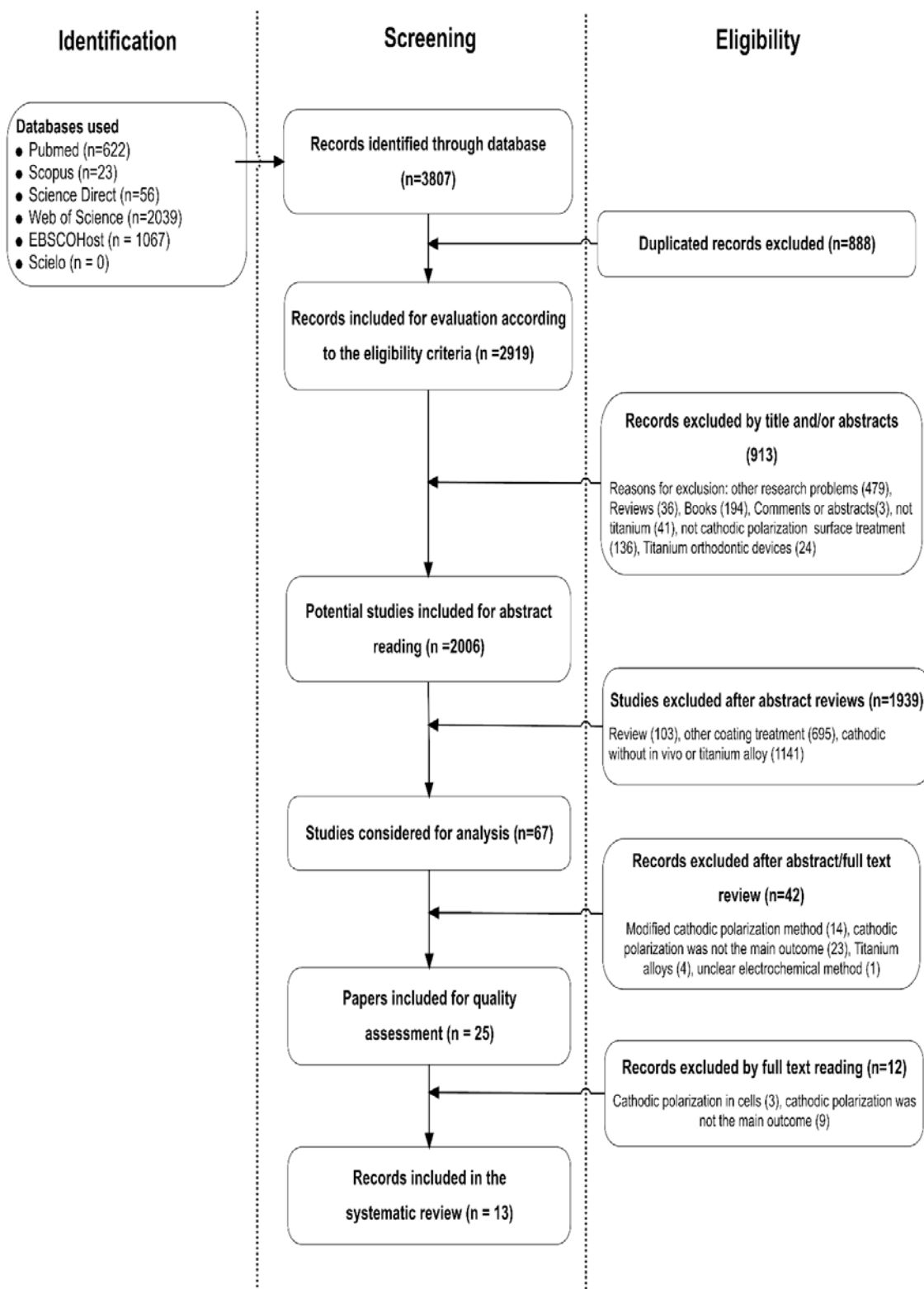


Fig 1. Flowchart information of the different phases of papers search and selection.

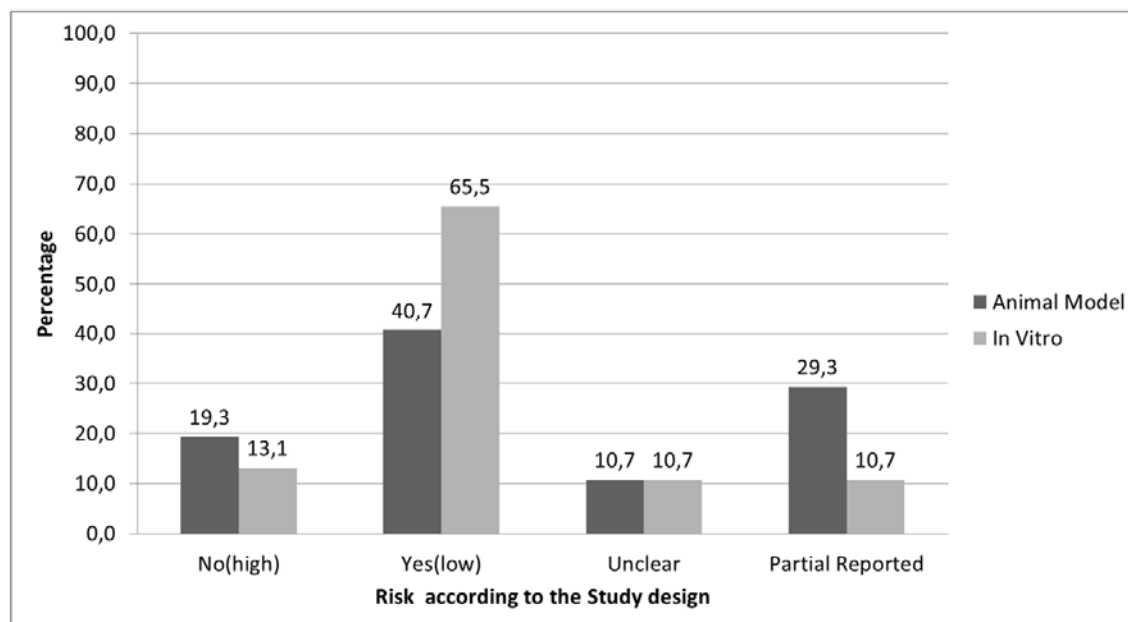


Fig 2. Risk according to the study design

6 Artigo 2

Preparation, characterization, and biocompatibility of different metal oxide/PEG-based hybrid coating synthesized by sol–gel dip coating for surface modification of titanium ²

Jose Carlos Bernedo Alcazar^{1¶}, R.M.J. Lemos^{2¶}, Bruno NoreMBERG^{2¶}, Marcus Cristian Muniz Conde^{1¶}, Luiz Alexandre Chisini^{1¶}, C.O. Avellaneda^{2¶}, Flávio Fernando Demarco^{1,3¶}, Sandra Beatriz Chaves Tarquinio^{1¶}, Neftali Lenin Villarreal Carreño^{1,2¶*}

¹Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

²Post-Graduate Program in Science and Material Engineering, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

³Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

*** Corresponding author:**

E-mail: neftali@ufpel.edu.br

² Artigo a ser publicado no Journal of Biomedical Materials Research Part A

Abstract

Surface modification to improve clinical efficacy of biomedical devices increase attention into dentistry field. The present article presented different doped and undoped organic-inorganic experimental nanocomposite materials synthesized via sol-gel dip coating. The sols consist of an inorganic-organic matrix based on ZrO_2 , TiO_2 , Li^+ and polyethylene glycol (PEG), which could be used in the biomedical field. The obtained hybrid-coated titanium samples have been characterized using atomic force microscope (AFM), and Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX) and cytotoxicity. AFM analysis detailed that the obtained materials were rough nanostructured hybrids. The EDX data allowed to know the quantitative percentage of the elements present on the surface of the hybrid-coated titanium samples. To evaluate the biocompatibility of the hybrid coatings in biomedical field have been evaluated by cytotoxicity test. The MTT cytotoxicity tests were carried out exposing a line of immortalized fibroblasts (3T3/NIH) for 48 h to extracts from the investigated hybrid coatings. The results showed that all the hybrid-coated titanium samples had a non-cytotoxic effect on target cells.

Key Words: Sol-gel synthesis, Dip coating technique, Organic-inorganic hybrid materials, PEG, Cell viability.

Introduction

The proportion of older people continue growing worldwide, as a result, the health and social policy-makers are facing challenges by the rapid changing burden of general and oral chronic diseases^{1,2}. Edentulism influence the quality of life of people, hence the used of prosthetic devices and/or dental implants returned successfully the lost functionally and aesthetics. Although, implant problems could commonly occurred in older adults, due to factor such as reduced bone formation. In this context, the global biomedical devices industry especially orthopedic implant are constantly looking for the advancements in implant designs, including materials that provide improved biocompatibility, durability, and expanded clinical applications³. Titanium (Ti) and its alloy represent the main biomaterial in the production of all kind of biomedical devices, and symbolize the gold standard in many fields of medicine, in particular, for orthopaedic and dental prosthetic devices into dentistry⁴⁻⁶. The clinical efficacy of these biomedical devices could be greatly enhanced by the modifying of nanofeatures onto surface that would improve the bioactivity, in order to induce a bioactive behavior and to enhance osseointegration between the biomedical devices and the surrounding bone or where implantable devices are being applied to reconstruct degraded tissues⁷⁻¹². Coating and other surface modification are useful techniques; as they allow us to optimize the surface properties while retaining favourable bulk properties^{4,7,8,13-15}, such as chemical vapour deposition¹⁶, plasma spray¹⁷, ion beam-assisted deposition¹⁸, radiofrequency magnetron sputtering¹⁹, notwithstanding, these techniques has a several drawbacks like expensive, complexity, long-term performance, non-homogeneity, non-control of thickness, lack of adherence¹⁴. A technique to synthesize a complex hybrid matrix of ceramic and glass materials, and that allows the doping of various inorganic, organic materials and biomolecules during the formation of a glassy matrix, is the sol-gel method^{14,20-22}. The sol-gel method uses an alkoxide or aqueous-based chemical routes, which is based mainly on the hydrolysis and condensation of metal alkoxides at low temperature. Thistechnique are supported by different coating techniques: spin, dip, and spray coating. The main feature is that allow the producing organic–inorganic nanocomposite materials, which makes possible entrapment of notorious thermolabile substances into the inorganic matrix, for instance, polymers or drugs^{23,24}. These are considered as biphasic materials, where the organic and inorganic phases are mixed at nanometer to micrometer scales, and their properties

are derived from a synergy between the individual contributions of both phase ²⁵. The sol-gel technique is an environmental friendliness and makes it an attractive technology for synthesizing highly bioactive and biocompatible materials^{21,26}.

The aim of this study was developed and characterized the biological response of biomimetic coatings on titanium surfaces for biomedical applications through the synthesis of four experimental oxide/PEG-based hybrid materials. The coatings consisting of organic–inorganic hybrid materials which have been prepared by sol–gel dip coating technique, consisting of a polymer polyethylene glycol (PEG) matrix reinforced with sol–gel synthesized PEG-based hybrid ZrO_2/PEG , TiO_2/PEG , $\text{TiO}_2:\text{Li}^+:\text{Zr}/\text{PEG}$, and $\text{TiO}_2:\text{Li}^+/\text{PEG}$ hybrid fillers, using different metal oxide zirconium (ZrO_2), Titanium (TiO_2), Lithium (Li^+).

Material and methods

Samples

This study used Titanium (Ti) F67- UNS R50400 (Realum[®]) square-shape samples with diameter 1x1 cm and thickness 2.25 mm, commercially pure grade II Titanium. Surfaces were polished under metallographic sander machine (polishing) (model Aropol-E, brand ARATEC), was set up the rotation at 200 rpm with silicon carbide papers for metallographic grinding in the sequence of P200, P400, P600, P800, P1200, and P2000 and finished (polishing or polishing and brightening) under colloidal granular deagglomerated alumina suspension (1 μm) were applied. After polishing, Ti samples were washed by a succession of different ultrasonic baths using Acetone, alcohol at 75%, and distilled water. Samples were afterward dried and stored under nitrogen cover gas chamber for 4 h. After drying, Samples surface were acid-etched in a mixture of hydrochloric and sulphuric acid at 125–130 °C for 6 min. finally, the samples were handled under nitrogen cover gas chamber and stored in 0.9% NaCl solution for 6 h, after that the samples were dried for 4 h.

Sol-gel synthesis

The ZrO_2/PEG , TiO_2/PEG , $\text{TiO}_2:\text{Li}^+:\text{ZrO}_2/\text{PEG}$, and $\text{TiO}_2:\text{Li}^+/\text{PEG}$ organic–inorganic hybrid were synthesized by means of sol-gel process, using Zirconium (IV) propoxide

(Sigma-Aldrich), Titanium (IV) isopropoxide (Sigma-Aldrich), and Lithium hydroxide monohydrate (Sigma-Aldrich), as a precursor of the inorganic matrix, and Poly (ethylene glycol) PEG (BioUltra, 400) as the organic component. Figure 1 shows the flow chart of the different hybrids synthesis and coating procedure. The hybrid systems were obtained under stirring, Figure 1A, $[\text{ZrO}_2/\text{PEG}]$, a 2.5 mL Zirconium(IV) propoxide solution ($\text{Zr}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_4$ Sigma Aldrich), was added to a mixture of 3,7 mL-Acetylacetone (Acac) and 10 mL-Ethyl Alcohol (ETOH), afterward was added 20 mL of distilled water and finally was added the mixture of 10mL-ETOH and 2mL-PEG. Figure 1B, $[\text{TiO}_2/\text{PEG}]$, a 2.4 mL Titanium (IV) isopropoxide ($\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$ Sigma Aldrich), was added to a mixture of 3,7 mL-Acetylacetone (Acac) and 10 mL-Ethyl Alcohol (ETOH), afterward was added 20 mL of distilled water and finally was added the mixture of 10mL-ETOH and 2mL-PEG. Figure 1C, $[\text{TiO}_2:\text{Li}^+:\text{ZrO}_2/\text{PEG}]$, a 2.4 mL Titanium (IV) isopropoxide ($\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$ Sigma Aldrich), was added to a mixture of 3,7 mL-Acetylacetone (Acac) and 10 mL-Ethyl Alcohol (ETOH), afterward was added 0.38 mL of ($\text{Zr}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_4$), followed by 20 mL of distilled water mixed with 0.05 g of Lithium hydroxide monohydrate (Vetec®) and finally was added the mixture of 10mL-ETOH and 2mL-PEG. Figure 1D, $[\text{TiO}_2:\text{Li}^+/\text{PEG}]$, a 2.4 mL Titanium (IV) isopropoxide ($\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$ Sigma Aldrich), was added to a mixture of 3,7 mL-Acetylacetone (Acac) and 10 mL-Ethyl Alcohol (ETOH), afterward was added 20 mL of distilled water mixed with 0.05 g of Lithium hydroxide monohydrate (Vetec®) and finally was added the mixture of 10mL-ETOH and 2mL-PEG. The reagent Acetylacetone for all hybrid systems was added to controlling the hydrolytic activity toward Zirconium (IV) propoxide and Titanium isopropoxide because it acts as a chelating agent. To synthesize the hybrid systems, PEG- based solutions with different doped and undoped metal oxide were added and four hybrid materials were obtained.

Coating procedure

The hybrid materials ZrO_2/PEG , TiO_2/PEG , $\text{TiO}_2:\text{Li}^+:\text{ZrO}_2/\text{PEG}$, and $\text{TiO}_2:\text{Li}^+/\text{PEG}$ synthesized by sol-gel process were used in a sol phase, to coat a titanium substrate (Ti F67- UNS R50400, Realum®), previously treated by polished and acid-etched.

As shown figure 1, the coated were obtained by means of the dip-coating technique and an MA765 Marconi® dip coater was used. The Ti-gr2 square-shape samples were dip-coated with a ZrO_2/PEG , TiO_2/PEG , $\text{TiO}_2:\text{Li}^+:\text{ZrO}_2/\text{PEG}$, and $\text{TiO}_2:\text{Li}^+/\text{PEG}$ hybrid

synthesized solution. Withdrawal speed of the substrate was 35 mm/min. The coated substrate was heat-treated at 45 °C for 24 h to promote the partial densification of the coating without any polymer degradation.

Biocompatibility study

Cytotoxicity assessment

Cytotoxicity assays are associated with different parameters of cell adhesion death and proliferation, the extracts for investigation was obtained from the surface of treatment-coated titanium. The essay was carried out by performing measurements in triplicate for each randomized group, which allows representing 100% viability. The recorded activities were compared with controls in parallel to the hybrid-coated titanium samples. The positive control (wells were seeded at a density of 10×10^4 cells/well (800 μ L) without the hybrid-coated titanium samples), and negative controls (wells were deposited with 800 μ L of media (DMem/FBS 90:10).

Specimens and cell culture medium

An 3T3/NIH immortalized fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Cultilab®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab®), 2% l-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml) (giBco-Brl), at a controlled atmosphere of 37°C in a 5% CO₂, at sub-confluence of (80%) were washed using phosphate buffered saline (PBS) (Gibco®), and afterward, were detached using 5 ml of 0.25% trypsin/EDTA (Gibco®).

MTT assay

The MTT test allows the analysis of cell viability by determining the levels of activity of mitochondrial dehydrogenases towards 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich®), through the formation of insoluble formazan crystals.

A3T3/NIH cell line were seeded on the hybrid-coated titanium samples into 48 well plates at a density of 10×10^4 cells/well (800 μ L), at a controlled atmosphere of 37°C in 5% CO₂. At 24 h of incubation, the hybrid-coated titanium samples were carefully transferred to a new 48 well plates and were again incubated with fresh media (800 μ L) for 24 h., afterward, the hybrid-coated titanium samples were washed with PBS. At 48 h of incubation, the hybrid-coated titanium samples were treated with 800 μ L of MTT (0.50 mg/ml), for 4 h at a controlled atmosphere of 37°C in 5% CO₂. The MTT solution was then removed and 800 μ L of DMSO was added to dissolve the formazan produced on the surface of the hybrid-coated titanium samples. Finally, the absorbance at 540 nm of each well was determined using a spectrophotometry (Universal ELISA reader). The cell adhesion viability was expressed by the absorbance values indicators of the hybrid-coated titanium samples with the extracts compared to a positive control. Descriptive and analytic analysis was performed using the SigmaPlot software version 12.0 (Systat Software, Inc.). Normality test was by the Shapiro-Wilk test and the differences between groups were due to the ANOVA and Tuckey test for multiple comparisons, considering a significance level of 5% ($p < 0.05$).

Samples characterization

The microstructure of the different hybrid systems-coated titanium samples was studied by a Digital Instruments Multimode atomic force microscope AFM (AutoProbe CP, Thermo microscopes), at an intermittent contact mode in a relative humidity 50% and 25 °C. The topographic images were preformatted by silicon tip (UL 2.0), at a resonance frequency of approximately 320 kHz and scan rate of 1 Hz. The percentage determination of the different elements present in the hybrid systems-coated titanium samples was ascertained by Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX - Ray Ny - EDX 720, Shimadzu), at [quali-quant] easy-metal mode, at two bands (Ti-U and Na-Sc) with 1 mm X-ray beam.

Results

Energy Dispersive X-ray Analysis (EDX)

EDX analysis results are shown in table 1. In Group 3, modified Titanium surfaces, presented mainly six components: TiO_2 , SO_3 , P_2O_5 , CaO , CuO and ZrO_2 . Modified Titanium surfaces from group 1 presented TiO_2 , SO_3 , P_2O_5 , CaO , and ZrO_2 . In Group 2, surface components included: TiO_2 , SO_3 , P_2O_5 , CaO and CuO . Modified Titanium disks from group 4 were composed by TiO_2 , SO_3 , P_2O_5 , CaO and CuO . Between the experimental groups, only G1 did not have CuO and groups 2 and 4 did not present ZrO_2 on the surface. G3 presented the lowest percentage of TiO_2 (73.11%) on the surface compared to the other groups.

Atomic Force Microscopy (AFM) analysis

AFM analysis of surface are showed in figure 2, 3, 4 and 5. Surfaces showed roughness surfaces in all experimental groups. G1 surfaces presented most of the peaks and valleys tall with a uniform distribution of them on the surface. G2 showed smaller peaks and valleys, relative uniform distribution but with the presence of very deep valleys. Titanium modified surfaces in G3 presented a uniform distribution, clearly define and regular peaks and valleys. In G4, peaks and valleys are smaller and presented uniform distribution with the presence of slightly deeper valleys than G3.

Cytotoxicity assessment

The description of cell viability due to cytotoxicity is shown in figure 6. In all groups, sol-gel dip coating test allowed cellular grown on the treated titanium surfaces. G3 (TiO_2/PEG , TiO_2 : Li^+ (15%): Zr (15%)/ PEG) showed higher cellular grown followed by G4 and G1. G2 showed the lower cellular viability. Comparison test results are presented in table 2. Experimental groups (G1, G2, G3, G4) showed statistically lower cellular viability comparing to the control group ($p < 0.05$). Groups G3 and G4 were statistically different ($p < 0.050$) from group G2, showing higher cellular grown.

Discussion

The present study formed biomimetic titanium surfaces using potential biocompatible materials based on Titania, Zirconia, Lithium oxides by the sol-gel dip coating method.

Sol-gel dip-coating technique can modified metal surfaces due to the deposition of organic / inorganic elements forming thin films on them. Studies usually used the technique to coated organic materials such as hydroxiapatite, due to the facility of the processing method, the low temperatures required, and the improvements of the produced coatings such as reduce thickness and homogeneous and high purity of the films ^{26,27}. In fact, the sol-gel method allowed to synthesized materials containing organic elements preserving their chemical structure and properties, that can be decomposed when exposed to higher temperatures than 250°C surfaces ^{28,29}. Inorganic sol-gel materials are brittle, thus studies included organic components into the inorganic network to improved properties and formed hybrid sol-gel coating ³⁰. The final material is considering more bioactive than others with similar compounds prepared with different methods and biocompatible ²⁶, therefore the method facilitate obtaining new biomaterials with medical applications ⁵.

This study, synthesized, by the sol-gel method, hybrid bioactive materials: ZrO_2/PEG ; TiO_2/PEG ; TiO_2/PEG , $TiO_2: Li^+(15\%): Zr (15\%)/PEG$ and $TiO_2 [2 M]: Li^+ (15\%)/PEG$ as experimental colloids using as precursors Zirconium Isopropoxide ($Zr(OCH(CH_3)_2)_4(CH_3)_2CHOH$); Polyethylene glycol ($H(OCH_2CH_2)_nOH$); Titanium Isopropoxide ($Ti[OCH(CH_3)_2]_4$); Lithium hydroxide monohydrate ($LiOH.H_2O$); Ethyl alcohol (CH_3CH_2OH) and Acetylacetone ($CH_3COCH_2COCH_3$). After sol- gel process, simple observation of the four experimental sols solutions showed to be transparent, uniform and homogeneous, being the viscosity of them quite similar between the sols. Basically, differences between the solutions were observed in the colour being the ZrO_2/PEG and the $Li^+ (15\%)/PEG$ yellowish and the $TiO_2 [2 M]: Li^+ (15\%)/PEG$ and TiO_2/PEG , $TiO_2: Li^+(15\%): Zr (15\%)/PEG$ sols brownish (Fig. 7). Moreover, after dip coating procedure, titanium surfaces showed a bright, glassy, transparent, yellowish and uniformed disposition of superficial film (Fig.8). Those characteristics were also reported by other study ²⁶. Characteristics of the sols can influence the properties of the final coatings, for instance the viscosity influence the thickness ²⁶ and homogeneity indicates the existence of connections at molecular level between the phases that can be weak (class I) or strong (Class II) consequently determining thermal behaviour, mechanical properties, stability or dispersion of the solution ³¹.

Pure inorganic crack free sol-gel materials represents a challenge, that's why the introduction of organic components into inorganic networks can improved properties of such material ³². Thus, our experiment synthetised new bioactive materials: ZrO₂/PEG; TiO₂/PEG; TiO₂/PEG; TiO₂/PEG, TiO₂: Li⁺(15%): Zr (15%)/PEG and TiO₂ [2 M]: Li⁺(15%)/PEG, the last ones not ever reported elsewhere. Synthesis and used of ZrO₂/PEG in different percentages was reported recently in one study. Catauro et al., 2014, showed that cell viability was higher on ZrO₂ 10–6-12–24-50 wt % PEG surfaces compared to uncoated titanium cells. The cellular viability improvement was attributed to the more concentration/percentage of PEG polymer in the hybrids, indicating that the sol-gel process preserved the PEG biocompatibility and transmitted the quality at hybrids ³³. Polyethylene glycol (PEG) is a biocompatible and biodegradable polymer used in the pharmaceutical field, as membrane for medical applications including cranial and vascular surgical procedures; and to promote bone grown ^{34,35}. The presence of PEG, in inorganic networks, was reported to reduce crack structures in the films, which is one more important disadvantages of the sol-gel method that happened during the gelification due to the elimination of water ³³. Polyethylene glycol present low toxicity, excellent solubility in aqueous solutions, extremely low immunogenicity and antigenicity. PEG is used as drug delivery due to is excellent pharmacokinetic and biodistribution behaviour and in biological systems due to its ability to increase hydrophilicity, biocompatibility and intrinsic resistance to protein adsorption.³⁶ For instance, hydrophilicity increased osseointegration in vitro and in vivo animal models ³⁷. Hydrogels membranes of PEG are commonly used in tissue engineering and regenerative medicine applications. PEG based hydrogels presented low cell attachment rate as a result of the formation of a hydrated surface layer that inhibits adsorption of adhesion proteins such as fibronectin, thus, other materials were incorporated to them³⁸. The mechanical strength of PEG hydrogel is determined by the molecular weight, cross linking and concentration of polymers. Its elastic modulus can be increased by decreasing the molecular weight or increasing the concentration of the polymer³⁹.

Bioactive materials such as glasses or glass ceramics promotes strong bond and stimulates new bone formation ⁴⁰. Studies showed that degradation of bioactive glass materials promotes increasing ion release compared to HCA minerals ⁴¹. After, cellular assays, titanium modified samples were submitted to EDX analysis, showing the

presence of Zirconia (ZrO_2), titanium dioxide (TiO_2), sulfur trioxide (SO_3), Phosphoric anhydride (P_2O_5), Calcium oxide (CaO), and Copper oxide (CuO). Zirconia (ZrO_2) present chemical stability, good mechanical properties in terms of resistance, wear and corrosion as well as adequate biological properties, enable osseointegration⁴² and new bone formation observed in animal models⁴³. Zirconium present in Zirconia, is an important ion that induce proliferation and differentiation of primary human osteoblasts through the activation of BMP2, SMAD1 as well as p-SMAD1/5 signaling pathways. Also promote growth and cellular differentiation; directly influencing bone calcification, since it promote the activation of bone formation⁴⁴.

Zinc, present in zirconia, is an important ion that is necessary for DNA replication and stimulates protein synthesis. Also promote cellular growth, differentiation, and development; and directly influence bone calcification and skeletal growth, since activate bone formation and inhibit bone resorption. Titanium (Ti) is a widely used biomaterial for biomedical purposes including orthopaedic and dental due to the great mechanical properties, such as high strength, fatigue resistance, corrosion resistance, relatively low elastic modulus and density, and its high biocompatibility. High biocompatibility of titanium is attributed to a thin ($\pm 26\text{nm}$) and stable oxide layer of TiO_2 mainly, formed on the surface exposed to air or fluids. Titanium oxide surface acidic and basic hydroxide types groups, linked to different bonds between the Ti surface cations and basic hydroxide coordinated to one Ti cation, which increased polarization and electron transfer from the oxygen atom to the Ti cation¹⁷. The isoelectric point (IEP) of TiO_2 range from 5-6.7, and in basic body, negative charge increase with pH^{17,45-47}. In the oxide film, it seems that alloying elements are not present, however the passive film is continuously dissolved and reconstructed in aqueous solutions, promoting the incorporation of different elements from solution onto the titanium oxide, such as calcium and phosphate forming calcium phosphate and calcium titanium phosphate at the outermost surface⁴⁸; and also release elements, such as metal ions from the titanium alloys generating phagocytosis of particles. Titanium surfaces coated by Titania were previously performed by sol-gel method, and studies have shown that titanium coatings can form calcium phosphate⁴⁹ - important composite capable to improved bonding to bone-; precipitate bone-like hydroxyapatite^{10,50} and facilitate osteogenesis of bone precursor cells⁵¹ in a fluid medium. Also, Calcium oxide (CaO) and Phosphoric anhydride (P_2O_5) were presented on titanium surface. The presence of Ti-OH groups on the surface, combined with the Ca^{2+} ions

present, can increase of positive charge on the surface, combine with the negative charge of the phosphate ions may formed an amorphous phosphate, and spontaneously transforms into hydroxyl-apatite[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] ^{26,44}. Indeed studies have reported that the presence of AOH groups on the material surface, positive Ca₂₊ ions and negative phosphates from a surface coating could induced spontaneously the formation of bone-like apatite on the implant surface ^{30,33}. Calcium and phosphates may regulate the initiation of cellular signals that enhance osteoblasts differentiation and influence intracellular signaling molecules in osteoblasts facilitating the mineralization process during bone formation. ³⁰

The presence of sulfure trioxide (SO₃) and cooper oxide in titanium-modified surfaces, in the authors believes, was induced during the acidic pre-treatment and during the dip coating process respectively. Sulfurs as oligoelements are component of the aminoacids methionine and cysteine, important to proteins ⁵² however the inorganic form can increased inflammatory cell response and altered cell adhesion⁵³. In bone tissue engineering, copper was reported to be an important angiogenic agent, by trigger endothelial cells towards angiogenesis. According to some authors, copper and angiogenesis growth factor FGF-2 present and synergistic stimulatory effects on angiogenesis, stimulating proliferation of human endothelial cells, as well as promote differentiation of mesenchymal stem cells towards the osteogenic lineage⁵⁴

In our study, all experimental groups showed adequate biocompatibility, promoting high cellular viability compared to the control group. Statistical differences were observed between the Ti- Zr-Li PEG group, presenting the higher cell grown, and the ZrO₂ PEG and TiO₂-PEG groups, having the lower cellular viability. Our results can be attributed to the hybrid coatings composition and to the different superficial morphologies of the obtained coatings that can improved cellular grown, since AFM results also allowed to observe more regular surfaces with less depressions also in Ti-Zr-Li PEG group and TiO₂-PEG groups. Cell attachment dependent on the protein that adsorbs onto the surface that determinate osteoinduction process, which is the recruitment of undifferentiated cells and consequent osteointegration; thus is highly influenced on the properties of surface such as chemistry, topography and hydrophobicity– hydrophilicity³⁴. In sol-gel materials, biological response depends on their surface properties such as topography, hydrophilicity, electronegativity and ionic dissolution in body environment. For instance, the contact angle of the surface

depends on the surface roughness and the possible presence of hydroxyl groups on the surface; and the photocatalytic activity is related to the chemical state of Titania and the surface area of the coating. TiO_2 present photocatalytic activity, which is directly related with the crystal properties, that means that photoinduced charges are generated in well-crystallized phases, preferably in the anatase allotropic form³². Titania can cristallized in homogeneous mixed of oxides; however the content of TiO_2 is limited to 20 wt%. TiO_2 crystallites formed a separate phase when titatium contents are high ⁵⁵. This could be one of the reasons why the presence of other oxides in the groups such as Zr and Li in the Ti- Zr-Li PEG and Ti- Li PEG showed better surface characteristics, since the less percentage of Titanium favoured the accomodations of Ti atoms in the network, forming more regular surfaces, more stable, and with regular roughness adequate to promoted better cellular grown. Undesirable irregular coating layers may modify the surface roughness and produce heterogeneous textures, interfering in osseointegration ^{56,57}. Roughness should be preserved even when molecules are incorporated to the surfaces ⁵⁸ since it is well know that represents an important factor on surfaces topographies that allowed cell adhesion and enhance osteoblast differentiation ⁵⁹. Osteoinduction is increasing in rough surfaces, due to the improvement of the wetting ability of the cells on the treated surfaces⁵⁸.

On the other hand, the presence of Lithium can be assumed to influence a better cellular response, since sol-gel derivated, Zirconia and Titania are poor conductors and ionic salts can increase ionic conductivity such as those based on lithium. Lithium in sol-gel dip coating methods is likely to be physical incorporated on the coating surface generally as part of it, which means that lithium ions adsorb or adjoin to crystals and fill in the space between them, and can increases conductivity. ⁶⁰ Studies demonstrated that Lithium ions, used in depressive disorders treatment ^{61,62}, reduced the risk of fractures in patients receiving the treatment and induced bone formation in animal model ^{63,64}. Lithium can inhibited the effects of 1,25-dihydroxy vitamin D consequently inhibit bone resorption, due to the influence in calcium-sensing receptor (CaSR) decreasing the sensitivity to calcium ⁶⁴. Moreover, Lithium ions (Li^+) were reported to function as a activator of the canonical Wnt signaling pathway, factor involved in mesenchimal stem cells differentiation toward osteoblastic lineage in vitro ⁶⁵⁻⁶⁷. Because of that, studies incorporate Li^+ to synthetised biocompatible materials and have demonstrated proliferation and differentiation of osteoblast-like cells in vitro

^{60,68-72}. After seven and 28 days, titanium lithium treated surfaces showed higher bone-specific osteocalcin and collagen type-1 alfa 1(COL1A1), as well as canonical Wnt co-receptors LRP5/6 and the Wnt target gene WISP1 gene expression compared from those without Li⁺^{65,73}. Lithium presence was also found to enhanced MG-63 cell attachment and early proliferation of them, maybe due to the stimulation of proliferation of human thyrocytes by activating Wnt/betacatenin signaling [17] or maybe due to changes in the structure of the film⁶⁰.

In our study, even though G1 and G2 presented lower cellular grown, cellular viability canbe considered to be high, and that could be attributed also to the presence of PEG that could influenced biological sol-gel properties. In ZrO₂ PEG film deposited on titanium surfaces lower wt% of PEG, influenced superficial morphology, as demonstrated by Catauro , in which surfaces with low wt%ZrO₂- PEG presented high amount of fractures, different from PEG hybrids with 24–50% that were free from them³³. In the study of Ääritalo, it was observed that the presence of PEG highly influence crack presence in TiO₂ surfaces, being surfaces without PEG cracked³². In our study titanium modified with TiO₂ PEG showed irregular not homogeneous surfaces with the presence of deep depressions. This was observed also in other study, in which TiO₂ PEG containing surfaces presented a slightly crack surface compared with TiO₂- Si PEG surfaces crack free, indicating chemical instability and problems in adhesion ³². Also, in the same study, the presence of PEG increased Hydrophilicity, reducing the contact angles compared to pure titanium and increase photocatalytic activity in modified surfaces of TiO₂ compared with those without PEG, that could be related to a better crystallized phases ³².

Limitations should be discussed. Even though the possible influence of Lithium on cellular responses could be assumed, the measure was not performed due to limitations of the EDX equipment. Other studies should be conducted in order to elucidate the influence of Lithium of the coatings on cellular behaviour and on surfaces topography.

As far as we know, the present study is presenting by the first time the combination of Titanium, Zirconium, Lithium and PEG were used as bioactive materials to modified titanium surfaces for biomedical approaches. Our results indicates that the all-experimental groups presented adequate biocompatibility. The TiO₂ [2 M]: Li⁺ (15%):

Zr (15%)/PEG group promoted significantly better surfaces characteristics and higher cellular grown. Further studies must be addressed investigating the cellular responses of odontoblastic cells types on TiO₂ [2 M]: Li⁺ (15%): Zr (15%)/PEG modified titanium.

References

1. Petersen PE, Kandelman D, Arpin S, Ogawa H. Global oral health of older people--call for public health action. *Community Dent Health* 2010;27(4 Suppl 2):257-67.
2. Petersen P, Yamamoto T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 2005;33(2):81-92.
3. Richards GR, Moriarty FT, Miclau T, McClellan RT, Grainger DW. Advances in Biomaterials and Surface Technologies. *Journal of Orthopaedic Trauma* 2012;26(12):703.
4. Sjöström T, Brydone AS, Meek DRM, Dalby MJ, Su B, McNamara LE. Titanium nanofeaturing for enhanced bioactivity of implanted orthopedic and dental devices. *Nanomedicine* 2013;8(1):89-104.
5. Owens GJ, Singh RK, Foroutan F, Alqaysi M, Han C-M, Mahapatra C, Kim H-W, Knowles JC. Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science* 2016;77:1-79.
6. Ferraris S, Spriano S, Pan G, Venturello A, Bianchi CL, Chiesa R, Faga MG, Maina G, Vernè E. Surface modification of Ti-6Al-4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2011;22(3):533-545.
7. Figueira RB, Silva CJR, Pereira EV. Organic-inorganic hybrid sol-gel coatings for metal corrosion protection: a review of recent progress. *Journal of Coatings Technology and Research* 2015;12(1):1-35.
8. Wang D, Bierwagen GP. Sol-gel coatings on metals for corrosion protection. *Progress in Organic Coatings* 2009;64(4):327-338.

9. Tsui YC, Doyle C, Clyne TW. Plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium substrates Part 1: Mechanical properties and residual stress levels. *Biomaterials* 1998;19(22):2015-2029.
10. Peltola T, Patsi M, Rahiala H, Kangasniemi I, Yli-Urpo A. Calcium phosphate induction by sol-gel-derived titania coatings on titanium substrates in vitro. *J Biomed Mater Res* 1998;41(3):504-10.
11. Catauro M, Bollino F, Veronesi P, Lamanna G. Influence of PCL on mechanical properties and bioactivity of ZrO₂-based hybrid coatings synthesized by sol-gel dip coating technique. *Materials Science and Engineering: C* 2014;39:344-351.
12. Catauro M, Bollino F, Papale F. Preparation, characterization, and biological properties of organic-inorganic nanocomposite coatings on titanium substrates prepared by sol-gel. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2014;102(2):392-399.
13. Koller G, Cook RJ, Thompson ID, Watson TF, Di Silvio L. Surface modification of titanium implants using bioactive glasses with air abrasion technologies. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2007;18(12):2291-2296.
14. Kulkarni M, Mazare A, Schmuki P, Iglič A. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. *Nanomedicine* 2014;5:112-130.
15. Mozafari M, Salahinejad E, Shabafrooz V, Yazdimamaghani M, Vashaei D, Tayebi L. Multilayer bioactive glass/zirconium titanate thin films in bone tissue engineering and regenerative dentistry. *International Journal of Nanomedicine* 2013;8:1665-1672.
16. Hampden-Smith MJ, Kostas TT. Chemical vapor deposition of metals: Part 2. Overview of selective CVD of Metals. *Chemical Vapor Deposition* 1995;1(2):39-48.
17. Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2004;47(3):49-121.
18. Choi J-M, Kim H-E, Lee I-S. Ion-beam-assisted deposition (IBAD) of hydroxyapatite coating layer on Ti-based metal substrate. *Biomaterials* 2000;21(5):469-473.

19. Jansen J, Wolke J, Swann S, Van Der Waerden J, De Groof K. Application of magnetron sputtering for producing ceramic coatings on implant materials. *Clinical oral implants research* 1993;4(1):28-34.
20. Choi AH, Ben-Nissan B. Sol-gel production of bioactive nanocoatings for medical applications. Part II: current research and development. *Nanomedicine* (London, England) 2007;2(1):51-61.
21. Gupta R, Kumar A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomedical materials* (Bristol, England) 2008;3(3):34005.
22. Mohseni E, Zalnezhad E, Bushroa AR. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: A review paper. *International Journal of Adhesion and Adhesives* 2014;48:238-257.
23. Judeinstein P, Sanchez C. Hybrid organic-inorganic materials: a land of multidisciplinary. *Journal of Materials Chemistry* 1996;6(4):511-525.
24. Sanchez C, Ribot F, Rozes L, Alonso B. Design of Hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites Synthesized Via Sol-Gel Chemistry. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2000;354(1):143-158.
25. Brinker CJ, Scherer GW. *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*: Academic press; 1989.
26. Catauro M, Papale F, Bollino F. Characterization and biological properties of TiO₂/PCL hybrid layers prepared via sol-gel dip coating for surface modification of titanium implants. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2015;415:9-15.
27. Ramires PA, Wennerberg A, Johansson CB, Cosentino F, Tundo S, Milella E. Biological behavior of sol-gel coated dental implants. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14(6):539-45.
28. Rodrigues D, Brennan A, Betrabet C, Wang B, Wilkes G. Structural features of sol-gel-derived hybrid inorganic-organic network ceramer materials by small-angle x-ray scattering. *Chemistry of materials* 1992;4(6):1437-1446.
29. Judeinstein P, Schmidt HK, Titman J, Stamm M. *Investigation of ion-conducting ormolytes: structure-property relationships*. 2010.
30. Catauro M, Bollino F, Papale F, Mozetic P, Rainer A, Trombetta M. Biological response of human mesenchymal stromal cells to titanium grade 4 implants coated with PCL/ZrO₂ hybrid materials synthesized by sol-gel route: in vitro evaluation. *Materials Science and Engineering: C* 2014;45:395-401.

31. Judeinstein P, Sanchez C. Hybrid organic–inorganic materials: a land of multidisciplinary. *J. Mater. Chem.* 1996;6(4):511-525.
32. Ääritalo V, Meretoja V, Tirri T, Areva S, Jämsä T, Tuukkanen J, Rosling A, Närhi T. Development of a Low Temperature Sol-Gel-Derived Titania-Silica Implant Coating. *Materials Sciences and Applications* 2010;1(3).
33. Catauro M, Bollino F, Papale F. Biocompatibility improvement of titanium implants by coating with hybrid materials synthesized by sol-gel technique. *J Biomed Mater Res A* 2014;102(12):4473-9.
34. Dahlin C, Johansson A, Hoffman M, Molenberg A. Early biocompatibility of poly (ethylene glycol) hydrogel barrier materials for guided bone regeneration. An in vitro study using human gingival fibroblasts (HGF-1). *Clin Oral Implants Res* 2014;25(1):16-20.
35. Thoma DS, Schneider D, Mir-Mari J, Hammerle CH, Gemperli AC, Molenberg A, Dard M, Jung RE. Biodegradation and bone formation of various polyethylene glycol hydrogels in acute and chronic sites in mini-pigs. *Clin Oral Implants Res* 2014;25(4):511-21.
36. Amiri B, Ghollasi M, Shahrousvand M, Kamali M, Salimi A. Osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells on modified PES-PEG electrospun fibrous composites loaded with Zn₂SiO₄ bioceramic nanoparticles. *Differentiation* 2016;92(4):148-158.
37. Yeo IS. Reality of dental implant surface modification: a short literature review. *Open Biomed Eng J* 2014;8:114-9.
38. Dadsetan M, Giuliani M, Wanivenhaus F, Brett Runge M, Charlesworth JE, Yaszemski MJ. Incorporation of phosphate group modulates bone cell attachment and differentiation on oligo(polyethylene glycol) fumarate hydrogel. *Acta Biomater* 2012;8(4):1430-9.
39. Sharma S, Srivastava D, Grover S, Sharma V. Biomaterials in Tooth Tissue Engineering: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR* 2014;8(1):309-315.
40. Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* 2013;9(1):4457-4486.
41. Foroutan F, de Leeuw NH, Martin RA, Palmer G, Owens GJ, Kim H-W, Knowles JC. Novel sol–gel preparation of (P₂O₅)_{0.4}–(CaO)_{0.25}–(Na₂O)_x–

- (TiO₂)(0.35-X) bioresorbable glasses (X = 0.05, 0.1, and 0.15). *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 2015;73(2):434-442.
42. Markhoff J, Mick E, Mitrovic A, Pasold J, Wegner K, Bader R. Surface Modifications of Dental Ceramic Implants with Different Glass Solder Matrices: In Vitro Analyses with Human Primary Osteoblasts and Epithelial Cells. *BioMed Research International* 2014;2014:7.
 43. Rocchietta I, Fontana F, Addis A, Schupbach P, Simion M. Surface-modified zirconia implants: tissue response in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(8):844-50.
 44. Chen Y, Roohani-Esfahani SI, Lu Z, Zreiqat H, Dunstan CR. Zirconium ions up-regulate the BMP/SMAD signaling pathway and promote the proliferation and differentiation of human osteoblasts. *PLoS One* 2015;10(1):e0113426.
Ali S, Farooq I, Iqbal K. A review of the effect of various ions on the properties and the clinical applications of novel bioactive glasses in medicine and dentistry. *Saudi Dent J* 2014;26(1):1-5.
 45. Park JH, Schwartz Z, Olivares-Navarrete R, Boyan BD, Tannenbaum R. Enhancement of surface wettability via the modification of microtextured titanium implant surfaces with polyelectrolytes. *Langmuir* 2011;27(10):5976-85.
 46. Catauro M, Bollino F, Papale F, Marciano S, Pacifico S. TiO₂/PCL hybrid materials synthesized via sol-gel technique for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C* 2015;47:135-141.
 47. Mohammed MT, Khan ZA, Siddiquee AN. Surface Modifications of Titanium Materials for developing Corrosion Behavior in Human Body Environment: A Review. *Procedia Materials Science* 2014;6:1610-1618.
 48. Hiromoto S, Hanawa T, Asami K. Composition of surface oxide film of titanium with culturing murine fibroblasts L929. *Biomaterials* 2004;25(6):979-986.
 49. Päätsi ME, Hautaniemi JA, Rahiala HM, Peltola TO, Kangasniemi IMO. Bonding Strengths of Titania Sol-Gel Derived Coatings on Titanium. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 1998;11(1):55-66.
 50. Li P, Kangasniemi I, de Groot K, Kokubo T. Bonelike Hydroxyapatite Induction by a Gel-Derived Titania on a Titanium Substrate. *Journal of the American Ceramic Society* 1994;77(5):1307-1312.
 51. Dieudonné SC, van den Dolder J, de Ruijter JE, Paldan H, Peltola T, van 't Hof MA, Happonen RP, Jansen JA. Osteoblast differentiation of bone marrow

- stromal cells cultured on silica gel and sol–gel-derived titania. *Biomaterials* 2002;23(14):3041-3051.
52. Carvalho DC, Coelho LM, Acevedo MSMSF, Coelho NMM. The oligoelements. *Handbook of Mineral Elements in Food*: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p 109-122.
 53. Sandstrom T, Stjernberg N, Andersson MC, Kolmodin-Hedman B, Lindstrom K, Rosenhall L. Cell response in bronchoalveolar lavage fluid after sulfur dioxide exposure. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 1989(2):142-146.
 54. Chen Q, Zhu C, Thouas GA. Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. *Progress in Biomaterials* 2012;1(1):2.
 55. Gao X, Wachs IE. Titania–silica as catalysts: molecular structural characteristics and physico-chemical properties. *Catalysis Today* 1999;51(2):233-254.
 56. Jung UW, Hwang JW, Choi DY, Hu KS, Kwon MK, Choi SH, Kim HJ. Surface characteristics of a novel hydroxyapatite-coated dental implant. *J Periodontal Implant Sci* 2012;42(2):59-63.
 57. Aksakal B, Hanyaloglu C. Bioceramic dip-coating on Ti-6Al-4V and 316L SS implant materials. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(5):2097-104.
 58. Silva TSN, Machado DC, Viezzer C, Silva Júnior AN, Oliveira MGd. Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation: an experimental study. *Acta Cirurgica Brasileira* 2009;24:200-205.
 59. Naddeo P, Laino L, La Noce M, Piattelli A, De Rosa A, Iezzi G, Laino G, Paino F, Papaccio G, Tirino V. Surface biocompatibility of differently textured titanium implants with mesenchymal stem cells. *Dent Mater* 2015;31(3):235-43.
 60. Wang J, de Groot K, van Blitterswijk C, de Boer J. Electrolytic deposition of lithium into calcium phosphate coatings. *Dent Mater* 2009;25(3):353-9.
 61. Gould TD, Manji HK. The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. *Neuroscientist* 2002;8(5):497-511.
 62. Malhi GS, Tanious M, Das P, Berk M. The science and practice of lithium therapy. *Aust N Z J Psychiatry* 2012;46(3):192-211.

63. Clément-Lacroix P, Ai M, Morvan F, Roman-Roman S, Vayssière B, Belleville C, Estrera K, Warman ML, Baron R, Rawadi G. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(48):17406-17411.
64. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Reduced Relative Risk of Fractures Among Users of Lithium. *Calcified Tissue International* 2005;77(1):1-8.
65. Thorfve A, Lindahl C, Xia W, Igawa K, Lindahl A, Thomsen P, Palmquist A, Tengvall P. Hydroxyapatite coating affects the Wnt signaling pathway during peri-implant healing in vivo. *Acta Biomater* 2014;10(3):1451-62.
66. Galli C, Passeri G, Ravanetti F, Elezi E, Pedrazzoni M, Macaluso GM. Rough surface topography enhances the activation of Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2010;95A(3):682-690.
67. Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL, Dunn GR, Appert C, Boyan BD, Schwartz Z. Role of non-canonical Wnt signaling in osteoblast maturation on microstructured titanium surfaces. *Acta Biomaterialia* 2011;7(6):2740-2750.
68. Han P, Wu C, Chang J, Xiao Y. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/ β -catenin signalling pathway by Li⁺ ions released from bioactive scaffolds. *Biomaterials* 2012;33(27):6370-6379.
69. Khorami M, Hesarakhi S, Behnamghader A, Nazarian H, Shahrabi S. In vitro bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass. *Materials Science and Engineering: C* 2011;31(7):1584-1592.
70. Shainberg APM, Valério P, Zonari A, Oktar FN, Ozyegin LS, Graça MPF, Leite MF, Goes AM. Attachment and Proliferation of Osteoblasts on Lithium-Hydroxyapatite Composites. *Advances in Materials Science and Engineering* 2012;2012:10.
71. de Boer J, Siddappa R, Gaspar C, van Apeldoorn A, Fodde R, van Blitterswijk C. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*;34(5):818-826.
72. Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso GM, Passeri G. GSK3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research* 2013;24(8):921-927.

73. Thorfve A, Bergstrand A, Ekstrom K, Lindahl A, Thomsen P, Larsson A, Tengvall P. Gene expression profiling of peri-implant healing of PLGA-Li+ implants suggests an activated Wnt signaling pathway in vivo. PLoS One 2014;9(7):e102597.

Table 1. EDX quantitative analysis of the experimental coated Titanium surfaces.

Experimental Groups	Percentages (%) of the elements presented on coated titanium material (Ti-U and Na-Sc)										
	TiO ₂	ZrO ₂	SO ₃	P ₂ O ₅	CaO	CuO	K ₂ O	In ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	SrO
G1	79.47	0.045	25.07	1.71	0.19	-	-	-	-	-	-
G2	73.93	-	24.00	1.78	0.28	0.02	-	-	-	-	-
G3	73.11	0.012	24.99	1.57	0.27	0.02	-	-	-	-	-
G4	76.24	-	22.39	1.10	0.25	0.01	-	-	-	-	-

G1= ZrO₂/PEG [2 M], **G2** = TiO₂/PEG [2 M]. **G3** = TiO₂ [2 M]: Li (15%): Zr (15%)/PEG, **G4** = TiO₂ [2 M]: Li (15%)/PEG; **GC**= Control Group.

Table 2. ANOVA for comparisons between the experimental groups (G1, G2, G3, G4, GC)

Experimental Groups	G1 Mean (SD)	G2 Mean (SD)	G3 Mean (SD)	G4 Mean (SD)	GC Mean (SD)
	2.300	2.249(0.139) ^c	2.402	2.385	2.983
Celular viability	(0.176) ^{bc}		(0.096) ^b	(0.156) ^b	(0.170) ^a

Different letters and symbols, means statistic difference ($p < 0.05$) SD: Standard Deviation
G1= ZrO₂/PEG [2 M], **G2** = TiO₂/PEG [2 M]. **G3** = TiO₂ [2 M]: Li (15%): Zr (15%)/PEG, **G4** = TiO₂ [2 M]: Li (15%)/PEG; **GC**= Control Group.

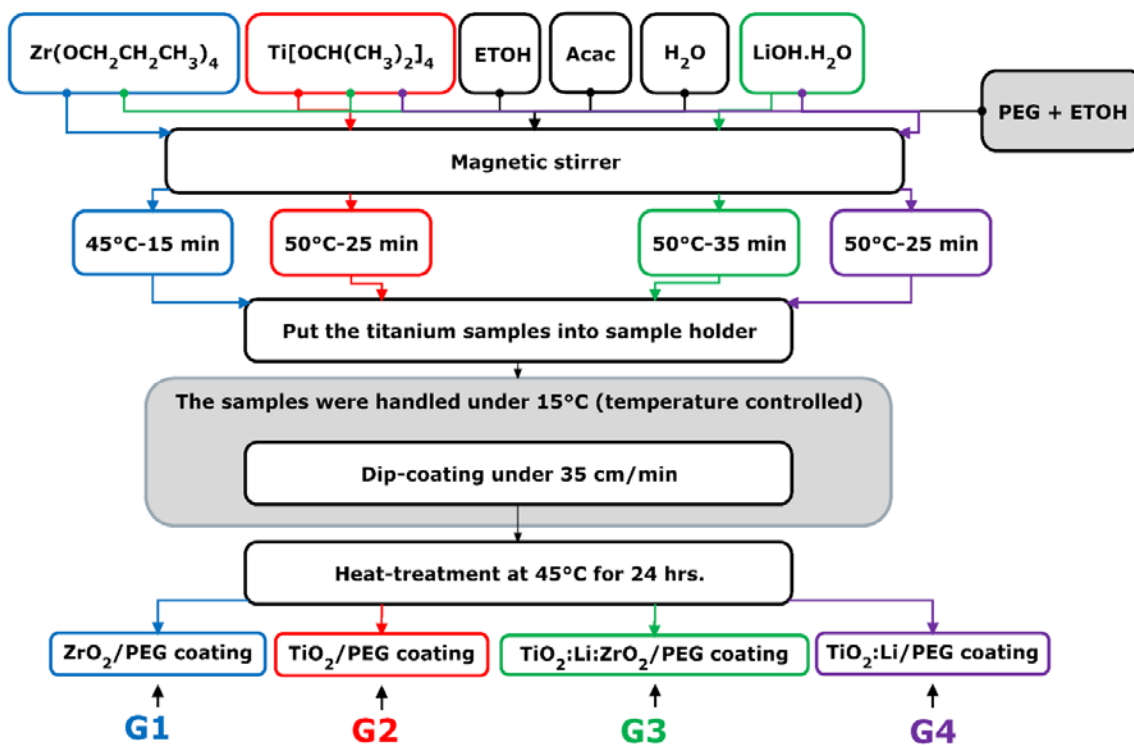


Figure 1 Flow chart of different hybrid systems by sol synthesis.

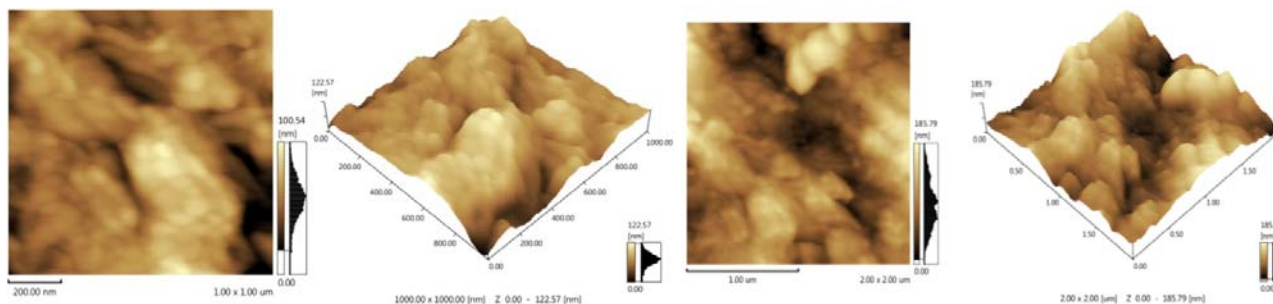


Figure 2. AFM analysis of experimental modified titanium in-group G1 (ZrO_2/PEG [2 M]).

A. Distance 1 μm B. Distance 2 μm .

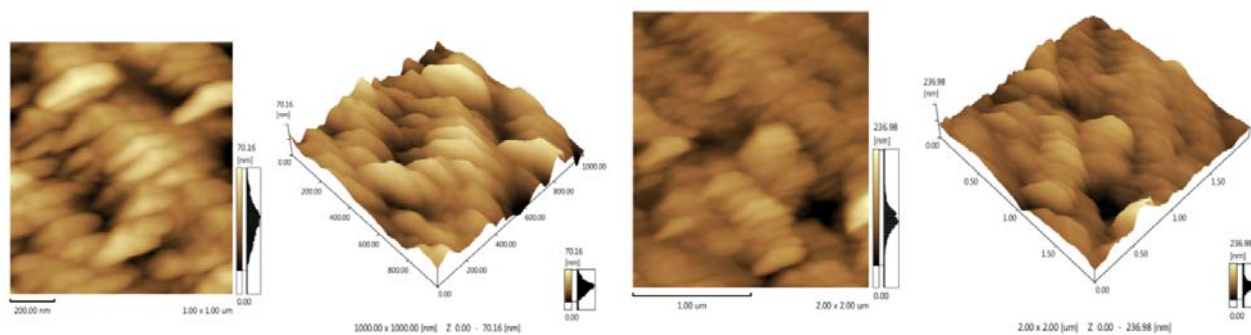


Figure 3. AFM analysis of experimental modified titanium in-group G2 (TiO_2/PEG [2 M]).

A. Distance 1 μ m B. Distance 2 μ m.

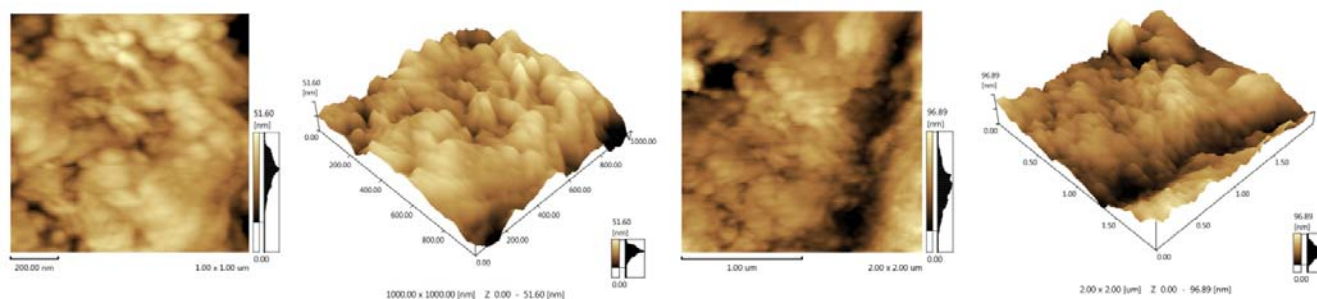


Figure 4. AFM analysis of experimental modified titanium in group G3 (TiO₂ [2 M]: Li⁺ (15%): Zr (15%)/PEG). A. Distance 1 μ m B. Distance 2 μ m.

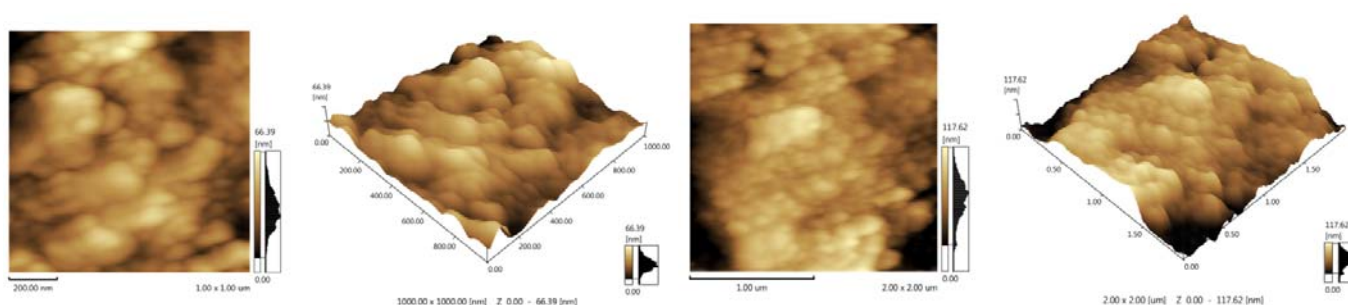


Figure 5. AFM analysis of experimental modified titanium in group G4 (TiO₂ [2 M]: Li⁺ (15%)/PEG). A. Distance 1 μ m B. Distance 2 μ m.

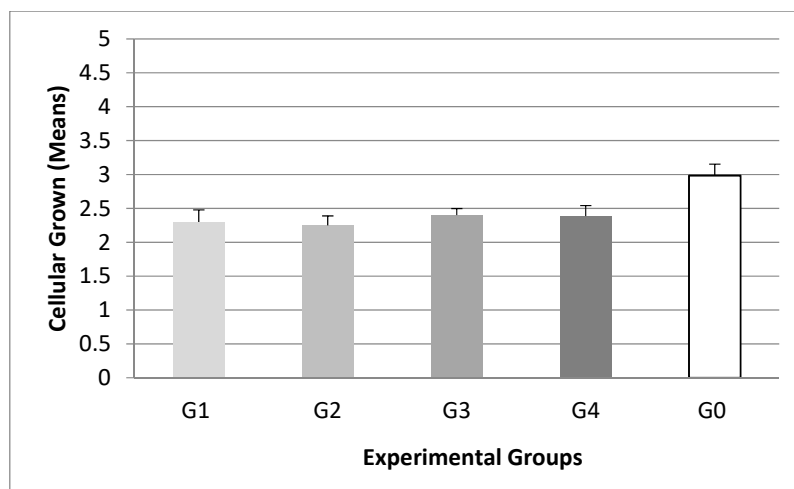


Figure6. Cell viability observed in experimental groups of Titanium disks coated by different sol solutions using the sol-gel dip coating method (G1,G2,G3,G4) and control group (GC) without sol solutions.

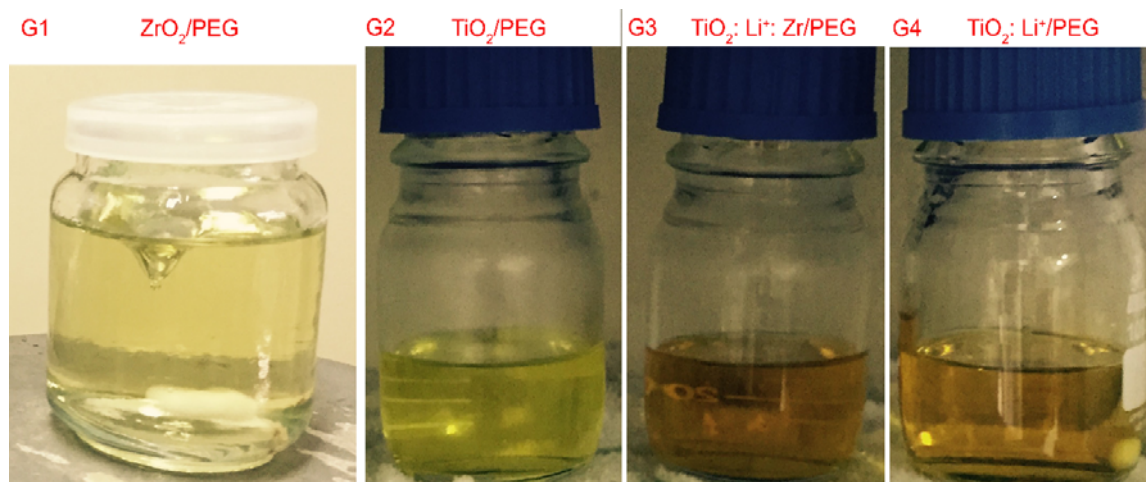


Figure7. Appearances of sol-gel sols (G1, G2, G3, G4)

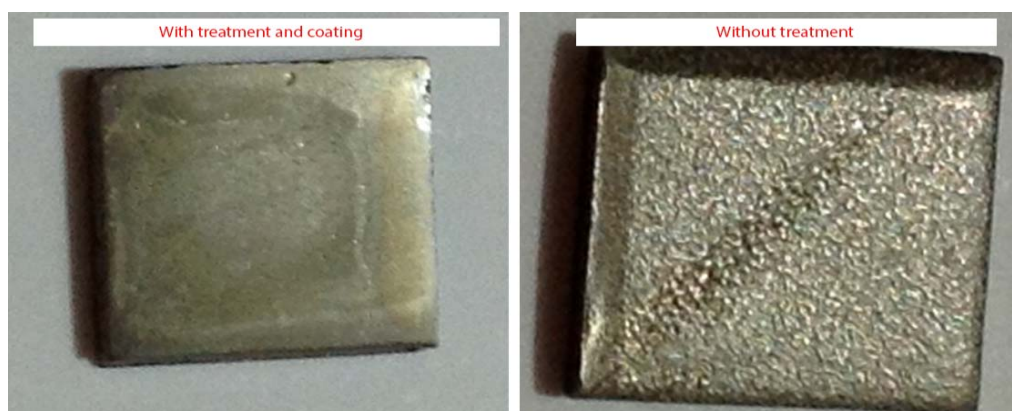


Figure 8. Appearances oftitanium treated after dip coating methods.

7 Artigo 3

Comparative biocompatibility analysis of different Titanium surface modification methods by Cathodic Polarization in acidic solutions and sol-gel dip coating with ITO and ZrO₂/PEG³

Jose Carlos Bernedo Alcazar^{1¶}, R.M.J. Lemos^{2¶}, Bruno Noremberg^{2¶}, Marcus Cristian Muniz Conde^{1¶}, Luiz Alexandre Chisini^{1¶}, Mabel. M S Salas^{4¶}, Flávio Fernando Demarco^{1,3¶}, Sandra Beatriz Chaves Tarquinio^{1¶}, Neftali Lenin Villarreal Carreño^{1,2¶*}

¹Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

²Post-Graduate Program in Science and Material Engineering, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

³Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

⁴Graduate Program of Dentistry, Federal University of Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brazil.

*** Corresponding author:**

E-mail: neftali@ufpel.edu.br

³ Artigo a ser publicado no Journal of Biomedical Materials Research Part A

Abstract

Titanium plays an important role in modern technology. Varieties of titanium based bone-level orthopedic implants are available on the market today with different features and specific purpose. The aim of this study was assessed the biocompatibility of surfaces of Titanium (Ti) modified with active materials (ITO and ZrO_2/PEG) by sol-gel dip coating and Cathodic Polarization, in order to investigate the potential of such processes for further improving surfaces for bone anchored the biomedical implant. The obtained coated titanium samples have been characterized using Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX). The EDX data allowed us to know the quantitative percentage of the element presents on the surface of the hybrid-coated titanium samples. To evaluate the biocompatibility of the modified coatings by sol-gel dip-coating and cathodic polarization in biomedical field have been evaluated by cytotoxicity test. The MTT cytotoxicity tests were carried out exposing a line of immortalized fibroblasts (3T3/NIH) for 48 h to extracts from the investigated hybrid coatings. The results showed that the hybrid-coated titanium samples presented a non-cytotoxic effect on target cells. The used of ITO by sol-gel dip coating, improved the cellular viability of the studied samples.

Key Words: Cathodic Polarization, Hydride, Sol–gel synthesis, Dip coating technique, Organic–inorganic hybrid materials, PEG, Cell viability.

Introduction

Biomedical implant devices represent successful alternatives for bone or dental substitution in healthy situation. Although implant complications may be present in elderly adults with abnormal or reduced bone healing process produced by certain health problems such as osteoporosis¹. In order to contoured this challenge, medical implants have been improved or modified by the inclusion of organic or inorganic materials thus it could be enhance bone regeneration ². Titanium (Ti) and its alloys are biocompatible materials considered gold standard for orthopaedic and dental prosthetic devices ³⁻⁵. Modifications of titanium surfaces were reported in studies, and showed to improved the bioactivity and osseointegration between the biomedical devices and the surrounding bone depending on the type of method and biomaterial used ⁶⁻⁹. Techniques such as chemical vapour deposition, plasma spray, ion beam-assisted deposition, radiofrequency magnetron sputtering, have demonstrated to active titanium surfaces increasing bone regeneration; the high cost, complex technique process and difficult control on the final coatings (non-homogeneity, non-control of thickness, lack of adherence) difficult its acquisition and increased the probability of failures¹⁰. The sol-gel dip coating is a technique that allowed to synthesize complex biphasic hybrid matrix of biomaterials, doping inorganic and/or organic materials and biomolecules on a glassy matrix, making also possible entrapment of notorious thermolabile substances into the inorganic matrix, such as polymers or drugs ^{11,12}. The sol-gel dip coating technique represent a low cost alternative, ease technique that facilitated the coated of organic materials in low ^{13,14}. Electrochemical techniques by the used of Cathodic polarization represent a saver ease method to included elements on surfaces using electropulses in lower temperatures. A recent systematic reviewed reported that the cathodic polarization method can effectively improved hydridation of titanium surfaces ¹⁰, deposit biomolecules ^{15,16} and enhanced the cellular response of modified titanium surfaces in vitro and in vivo-animal models ¹⁶. Indeed, studies reported the ability of both methods to promote the inclusion of biomaterial on titanium surfaces ^{15,17}. Bioactive materials can stimulate beneficial responses from the body; it means that in bone generation such materials can stimulates bone grown and regeneration. Thus, novel biomaterials are tested in order to not only improved mechanical properties of biomaterials but to increased cellular responses in terms of proliferation and differentiation ¹⁸.

In this context, the aim of the present study was to compare the cellular viability using two potential biomaterials (ITO and ZrO_2/PEG) by the sol–gel dip coating and acidic solution by cathodic reduction on commercially pure grade II Titanium, in order to investigate the potential of such a material and process for finding an improved surface for bone anchored orthopedic implant.

Material and methods

The ITO and ZrO_2/PEG , organic–inorganic hybrid were synthesized by means of sol-gel process, using Zirconium (IV) propoxide (Sigma-Aldrich), and indium nitrate (III) hydrate –Tin(IV) chloride anhydrous (Sigma-Aldrich), as a precursor of the inorganic matrix, and Poly (ethylene glycol) PEG (BioUltra, 400) and Ethylene glycol (BioUltra, $\geq 99.5\%$) (Sigma-Aldrich), as the organic component. The cathodic polarization was performance in acidic solutions of acetic acid and sodium acetate (Sigma-Aldrich).

Samples

This study used a Titanium (Ti) F67- UNS R50400 (Realum®) square-shape samples with diameter 1x1 cm and thickness 2.25 mm, commercially pure grade II Titanium. Surfaces were polished under metallographic sander machine (polishing) (model Aropol-E, brand ARATEC), was set up the rotation at 200 rpm with silicon carbide papers for metallographic grinding in the sequence of P200, P400, P600, P800, P1200, and P2000 and finished (polishing or polishing and brightening) under colloidal granular deagglomerated alumina suspension ($1\mu\text{m}$) were applied. After polishing, Ti samples were washed by a succession of different ultrasonic baths using Acetone, alcohol at 75%, and distilled water. Samples were afterward dried and stored under nitrogen cover gas chamber for 4 h. After drying, Samples surface were acid-etched in a mixture of hydrochloric and sulphuric acid at $125\text{--}130\text{ }^\circ\text{C}$ for 6 min. finally, the samples were handled under nitrogen cover gas chamber and stored in 0.9% NaCl solution for 6 h, after that the samples were dried for 4 h.

Sol-gel synthesis

Figure 1 shows the flow chart of the two hybrids synthesis and coating procedure. The hybrid systems were obtained under stirring, Figure 1-A, a mixture of 2,42 g of Indium nitrate (III) hydrate 99.99% ($\text{In}(\text{NO}_3)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) and 4 μL of Tin (IV) chloride anhydrous 99.995% (SnCl_4) in 20 mL of Ethyl Alcohol (ETOH). Ethylene glycol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) - 0.84 mL and acetyl acetone - 0.03 mL were added to the mixture, which was stirred at room temperature for 24 h. Afterward, the was obtained a clear viscous solution. Figure 1-B[ZrO_2 /PEG], a 2.5 mL Zirconium(IV) propoxide solution ($\text{Zr}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_4$ Sigma Aldrich), was added to a mixture of 3,7 mL-Acetylacetone (Acac) and 10 mL-Ethyl Alcohol (ETOH), afterward was added 20 mL of distilled water and finally was added the mixture of 10mL-ETOH and 2mL-PEG.

Coating procedure

The precursor hybrid composites of ITO and ZrO_2 /PEG, still in the sol phase, was coats on titanium substrates (Ti F67- UNS R50400, Realum[®]), previously treated by polished and acid-etched.

As shown figure 1-A, the coated were obtained by means of the dip-coating technique and an MA765 Marconi[®] dip coater was used. The Ti-gr2 square-shape samples were dip-coated with ITO hybrid synthesized solution. The first samples was not soaking in NaCl-0,9%, and the withdrawal speed of the substrate was 38 mm/min. the second was soaking in NaCl-0,9%, and the withdrawal speed of the substrate was 20 mm/min. The both coated substrate were heat-treated at 150 °C for 30 min. The ZrO_2 /PEG samples were dip-coated; at withdrawal, speed of the substrate was 35 mm/min. The coated substrate was heat-treated at 45 °C for 24 h to promote the partial densification of the coating without any polymer degradation.

Cathodic Polarization

The setup used for cathodic polarization consisted of a power supply connected to the sample cathode and a platinum anode (AUTOLAB Metrohm, AUT85833) and a magnetic stirrer with heating at 21 °C. The platinum electrode had a semicircular shape and the samples were always placed in the center of Pt-electrode to ensure and equal horizontal and vertical distance between the two electrodes for all samples. The pH was controlled every 30 min by using pH-indicator strips MColorpHast. Polarization

was performed in 200 mL of a 2 molar buffer solution mixed of acetic acid and sodium acetate at pH3. The software Nova version 1.1 (AUTOLAB Metrohm, AUT85833) controlled the experimental parameters like current and duration of experiment. The square-shape sample acted as the cathode during cathodic reduction. Samples were processed for 1.6 mA/cm² for 8hr.

Biocompatibility study

Cytotoxicity assessment

Cytotoxicity assays are associated with different parameters of cell adhesion death and proliferation, the extracts for investigation was obtained from the surface of treatment-coated titanium. The essay was carried out by performing measurements in triplicate for each randomized group, which allows representing 100% viability. The recorded activities were compared with controls in parallel to the hybrid-coated titanium samples. The positive control (wells were seeded at a density of 10×10^4 cells/well (800 μ L) without the hybrid-coated titanium samples), and negative controls (wells were deposited with 800 μ L of media (DMem/FBS 90:10).

Specimens and cell culture medium

An 3T3/NIH immortalized fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Cultilab®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab®), 2% L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml) (Gibco-Brl), at a controlled atmosphere of 37°C in a 5% CO₂, at sub-confluence of (80%) were washed using phosphate buffered saline (PBS) (Gibco®), and afterward, were detached using 5 ml of 0.25% trypsin/EDTA (Gibco®).

MTT cell viability test

The MTT test allows the analysis of cell viability by determining the levels of activity of mitochondrial dehydrogenases towards 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich®), through the formation of insoluble formazan crystals.

A3T3/NIHcell line were seeded on the hybrid-coated titanium samples into 48 well plates at a density of 10×10^4 cells/well (800 μ L), at a controlled atmosphere of 37°C in 5% CO₂. At 24h of incubation, the hybrid-coated titanium samples were carefully transferred to a new 48 well plates and were again incubated with fresh media (800 μ L) for 24 h., afterward, the hybrid-coated titanium samples were washed with PBS. At 48 h of incubation, the hybrid-coated titanium samples were treated with 800 μ L of MTT (0.50 mg/ml), for 4h at a controlled atmosphere of 37°C in 5% CO₂. The MTT solution was then removed and 800 μ L of DMSO was added to dissolve the formazan produced on the surface of the hybrid-coated titanium samples. Finally, the absorbance at 540 nm of each well was determined using a spectrophotometry (Universal ELISA reader). The cell adhesion viability was expressed by the absorbance values indicators of the hybrid-coated titanium samples with the extracts compared to a positive control. Descriptive and analytic analysis was performed using the SigmaPlot software version 12.0 (Systat Software, Inc.). Normality test was by the Shapiro-Wilk test and the differences between groups were due to the Kruskal Wallis test and Dunnett test for multiple comparisons, with a significance level of 5% ($p < 0.05$).

Samples characterization

The percentage determination of the different elements present in the hybrid systems-coated titanium samples was ascertained by Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX - Ray Ny - EDX 720, Shimadzu), at [quali-quant] easy-metal mode, at two bands (Ti-U and Na-Sc) with 1mm X-ray beam.

Results

Cytotoxicity test

Cytotoxicity test results can be observed in figure 2. Cellular grown on the treated titanium surfaces were different in the titanium treated surfaces (Table 1). Comparisons between groups allowed to observed that cellular viability in the control group and in G6 was not statistical different, however the cellular grown was higher in the control group and lower in the groups G2, G5 and P1 ($p < 0.05$). G6 showed the highest cellular viability compared to the experimental groups, but there was not statistical difference between G6 and G2. Groups G6 and G2 were statistically different

from groups G5 and P1 ($p < 0.050$) showing higher cellular grown. P1 presented the lowest cellular grown and showed statistical differences with G5 ($p < 0.05$).

Energy Dispersive X-ray Analysis (EDX)

Results of EDX analysis are shown in table 2. Groups 5 and 6 showed that Titanium modified surfaces presented: TiO_2 , SO_3 , P_2O_5 , CaO , CuO , K_2O and In_2O_3 . In Group 2, surface components included: TiO_2 , ZrO_2 , SO_3 , P_2O_5 and CaO . Modified Titanium disks from P1 group were composed by TiO_2 , SO_3 , P_2O_5 , CaO , CuO and Fe_2O_3 . Between the experimental groups, P1 presented the lowest percentage of TiO_2 (67.59) and P_2O_5 (1.28) and the highest percentage of SO_3 (31.00). Also, G2 presented the highest percentage of CaO (28.03) and P_2O_5 (2.14) on the surface compared to the other groups.

Discussion

The aim of the present study was to modified titanium surface for medical purposes using new bioactive elements ($\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$ and ZrO_2/PEG [2 M]) by the sol-gel dip coating technique and the cathodic polarization electrochemical method.

We synthesized, by the sol-gel method, hybrid bioactive materials: ZrO_2/PEG and $\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$ sols. $\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$ sol showed to be transparent, uniform and homogeneous (Figure 3-A). After dip coating formed glassy, transparent and uniformed disposition coatings (Figure 3-C). ZrO_2/PEG sol had similar characteristics however was yellowish (Figure 3 -B, C). Visual analysis showed similar viscosity in both sols (Figure 3 -A, B). Characteristics of the sols, can influence the coating properties, for instance homogeneity is associated with the connections at molecular level between the phases being weaker or stronger, and viscosity influence the thickness thus determining physical and, mechanical properties^{14,19}. The high transparency of ITO sol allowed its bioapplicability as electrode element in implantable microelectrodes²⁰. Sol-gel dip coating is a promise ease-technique method to modified titanium surfaces that allowed to formed biphasic thin and homogeneous coatings of organic and inorganic elements using low temperatures, which is important to preserved the elements characteristics^{14,21}. Indeed, temperature influence directly the adhesion and the thickness of the final coatings, thus techniques that allowed to used low temperature to modified and/or included elements on titanium surfaces are preferable, such as the cathodic

polarization electrochemical method ¹⁶. Cathodic polarization treatment is a simpler process method that needs low temperatures to modified and activate titanium surfaces producing hydride layers ¹⁰, and also allowing to deposit biomolecules on it ^{15,16}. Studies using both techniques, have shown that surfaces of titanium modified by Sol-gel dip coating technique and Cathodic polarization electrochemical method, can enhance cellular response in vitro and in vivo-animal models ^{16,22,23}. In fact, cell adhesion is an essential process directly involved in cell growth, migration and differentiation. Our results showed that even though the four experimental groups promoted cellular grown, the groups that were submitted to the sol-gel dip coating technique allowed higher cellular viability. In this study, electrochemical cathodic polarization was used to modified titanium by hydridation using $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ as buffer and any bioactive material was coated on surfaces of titanium. In the sol-gel dip coating groups, bioactive elements were coated on titanium surfaces and showed higher cellular viability. Thus, our findings could be related to the presence of the bioactive elements included by the sol-gel dip coating method. Bioactive glasses or glass ceramics can stimulate bone formation and increased bone bond to titanium surfaces ¹⁸. Also ion release can be high due to their degradation process that don't suffered rapid saturation as in hydroxiapatite materials ²⁴.

In our study, cellular viability was higher in-group G6 ($\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$) and in groups G2 (ZrO_2/PEG [2 M]), being G6 statistically comparable to the Control group, that means that the cellular grown was almost the same. This could be related to the Indium tin oxide presence. Indium tin oxide (ITO), have been reported to be useful to detect fragment ions from proteins ²⁵ and to enhanced photocatalysts as titanium films ¹⁷. Selvakumaran et al., reported the high biocompatibility of Indium tin oxide and its performance to promoted faster rate of protein adsorption in the first 7 days of experiment and desorption occurrence after that period ²⁰. According to authors, protein adsorption is an important key that determined biocompatibility of the material and the in vivo performance of implants²⁰, since it is the initial event that occurred when a foreign material is implant in the body influencing subsequent reactions of adsorption of proteins, cells, and microorganisms ^{26,27}. The better biological response of G6 ($\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$) can be also attributed to some differences in the processing phases: for acid etching washing we used NaCl-0,9% and the dip coating time was reduced to 15 cm /minute, different from G5 ($\text{In}_2\text{O}_5\text{Sn}$), the other ITO group, that used 38cm/min during the dip coating method. In sol-gel dip coating method, withdrawal speed influence the

thickness of the final coating , higher speeds produced thicker coatings and inversely lower speeds produced thinner coatings ²⁸. Thickness of coatings is an important characteristic for biologic bone response²⁹. Hence it could be assumed that group G6 modified titanium surfaces presented thinner thickness.

On the other hand, high cellular viability of G2 can be attributed to the presence of Zirconia (ZrO₂). studied have shown that Zirconia (ZrO₂) present chemical stability, good mechanical properties in terms of resistance, wear and corrosion; and is highly biocompatible, enable osseointegration and new bone formation in cellular essays and in animal models ^{30,31}. Zinc, from zirconia, is essential in DNA replication and stimulates protein synthesis, participates in cellular development and differentiation; and influence bone calcification and skeletal growth, since activate bone formation and inhibit bone resorption ³²

The main objective of the study was to test the biocompatibility of the experimental modified titanium surfaces, nevertheless some limitations regarding the coating characterization - such as viscosity, thickness, adsorption capacity, secondary ion mass spectroscopy, XPS analysis, contact angle measurements, among others - could be performed in order to better understand the performance of the experimental groups associated to cellular grown.

The present study showed ITO as an important biocompatible material that can promoted high cellular grown on medical titanium. It is the authors believe that even though cellular grown was lower by the cathodic polarization, it is feasible to used the technique with biomolecules to increased positive reactions.

References

1. Alghamdi HS, Jansen JA. Bone regeneration associated with nontherapeutic and therapeutic surface coatings for dental implants in osteoporosis. *Tissue Eng Part B Rev* 2013;19(3):233-53.
2. Richards GR, Moriarty FT, Miclau T, McClellan RT, Grainger DW. Advances in Biomaterials and Surface Technologies. *Journal of Orthopaedic Trauma* 2012;26(12):703.
3. Sjöström T, Brydone AS, Meek DRM, Dalby MJ, Su B, McNamara LE. Titanium nanofeaturing for enhanced bioactivity of implanted orthopedic and dental devices. *Nanomedicine* 2013;8(1):89-104.
4. Owens GJ, Singh RK, Foroutan F, Alqaysi M, Han C-M, Mahapatra C, Kim H-W, Knowles JC. Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science* 2016;77:1-79.
5. Ferraris S, Spriano S, Pan G, Venturello A, Bianchi CL, Chiesa R, Faga MG, Maina G, Vernè E. Surface modification of Ti-6Al-4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2011;22(3):533-545.
6. Wang D, Bierwagen GP. Sol-gel coatings on metals for corrosion protection. *Progress in Organic Coatings* 2009;64(4):327-338.
7. Peltola T, Patsi M, Rahiala H, Kangasniemi I, Yli-Urpo A. Calcium phosphate induction by sol-gel-derived titania coatings on titanium substrates in vitro. *J Biomed Mater Res* 1998;41(3):504-10.
8. Catauro M, Bollino F, Veronesi P, Lamanna G. Influence of PCL on mechanical properties and bioactivity of ZrO₂-based hybrid coatings synthesized by sol-gel dip coating technique. *Materials Science and Engineering: C* 2014;39:344-351.
9. Catauro M, Bollino F, Papale F. Preparation, characterization, and biological properties of organic-inorganic nanocomposite coatings on titanium substrates prepared by sol-gel. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2014;102(2):392-399.
10. Pachauri P, Bathala LR, Sangur R. Techniques for dental implant nanosurface modifications. *J Adv Prosthodont* 2014;6(6):498-504.

11. Judeinstein P, Sanchez C. Hybrid organic–inorganic materials: a land of multidisciplinary. *Journal of Materials Chemistry* 1996;6(4):511-525.
12. Sanchez C, Ribot F, Rozes L, Alonso B. Design of Hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites Synthesized Via Sol-Gel Chemistry. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2000;354(1):143-158.
13. Gupta R, Kumar A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomedical materials (Bristol, England)* 2008;3(3):34005.
14. Catauro M, Papale F, Bollino F. Characterization and biological properties of TiO₂/PCL hybrid layers prepared via sol–gel dip coating for surface modification of titanium implants. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2015;415:9-15.
15. Frank MJ, Walter MS, Rubert M, Thiede B, Monjo M, Reseland JE, Haugen HJ, Lyngstadaas SP. Cathodic Polarization Coats Titanium Based Implant Materials with Enamel Matrix Derivate (EMD). *Materials* 2014;7(3):2210-2228.
16. Alcazar JCB, Salas MMS, Conde MCM, Chisini LA, Demarco FF, Tarquinio SBC, Carreño NLV. Electrochemical Cathodic Polarization, a Simplified Method That Can Modified and Increase the Biological Activity of Titanium Surfaces: A Systematic Review. *PLoS ONE* 2016;11(7):e0155231.
17. Subrahmanyam A, Rajakumar A, Rakibuddin M, Paul Ramesh T, Raveendra Kiran M, Shankari D, Chandrasekhar K. Efficacy of titanium doped-indium tin oxide (Ti/TiO₂-ITO) films in rapid oxygen generation under photocatalysis and their suitability for bio-medical application. *Phys Chem Chem Phys* 2014;16(45):24790-9.
18. Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* 2013;9(1):4457-4486.
19. Judeinstein P, Sanchez C. Hybrid organic–inorganic materials: a land of multidisciplinary. *J. Mater. Chem.* 1996;6(4):511-525.
20. Selvakumaran J, Keddie JL, Ewins DJ, Hughes MP. Protein adsorption on materials for recording sites on implantable microelectrodes. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(1):143-51.
21. Ramires PA, Wennerberg A, Johansson CB, Cosentino F, Tundo S, Milella E. Biological behavior of sol-gel coated dental implants. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14(6):539-45.

22. Aksakal B, Hanyaloglu C. Bioceramic dip-coating on Ti-6Al-4V and 316L SS implant materials. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(5):2097-104.
23. Naddeo P, Laino L, La Noce M, Piattelli A, De Rosa A, Iezzi G, Laino G, Paino F, Papaccio G, Tirino V. Surface biocompatibility of differently textured titanium implants with mesenchymal stem cells. *Dent Mater* 2015;31(3):235-43.
24. Foroutan F, de Leeuw NH, Martin RA, Palmer G, Owens GJ, Kim H-W, Knowles JC. Novel sol-gel preparation of $(\text{P}_2\text{O}_5)_{0.4}-(\text{CaO})_{0.25}-(\text{Na}_2\text{O})_X-(\text{TiO}_2)_{(0.35-X)}$ bioresorbable glasses ($X = 0.05, 0.1, \text{ and } 0.15$). *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 2015;73(2):434-442.
25. Aoyagi S, Inoue M, Mitsuoka T. The effect of thin oxide film on protein sample measurement with TOF-SIMS. *Surface and Interface Analysis* 2011;43(1-2):272-276.
26. Wahlgren M, Arnebrant T. Protein adsorption to solid surfaces. *Trends in Biotechnology* 1991;9(1):201-208.
27. Williams DF, Askill IN, Smith R. Protein adsorption and desorption phenomena on clean metal surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* 1985;19(3):313-320.
28. Brinker CJ. Dip Coating. In: Schneller T, Waser R, Kosec M, Payne D, editors. *Chemical Solution Deposition of Functional Oxide Thin Films*. Vienna: Springer Vienna; 2013. p 233-261.
29. Sul YT, Johansson C, Wennerberg A, Cho LR, Chang BS, Albrektsson T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20(3):349-59.
30. Markhoff J, Mick E, Mitrovic A, Pasold J, Wegner K, Bader R. Surface Modifications of Dental Ceramic Implants with Different Glass Solder Matrices: In Vitro Analyses with Human Primary Osteoblasts and Epithelial Cells. *BioMed Research International* 2014;2014:7.
31. Rocchietta I, Fontana F, Addis A, Schupbach P, Simion M. Surface-modified zirconia implants: tissue response in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(8):844-50.
32. Ali S, Farooq I, Iqbal K. A review of the effect of various ions on the properties and the clinical applications of novel bioactive glasses in medicine and dentistry. *Saudi Dent J* 2014;26(1):1-5.

Table 1. Comparisons between the experimental groups and the control group (G1, G2, G3, G4, GC) (Kruskal Wallis test and Dunn's test for comparisons between groups).

Experimental Groups	G2	G5	G6	P1	GC
	Median (SD)	Median (SD)	Median (SD)	Median (SD)	Median (SD)
Viabilidade celular	2.241 (0.358) ^b	1.459 (0.690) ^c	2.493 (0.278) ^{ab}	1.240 (0.182) ^d	2.987 (0.240) ^a

*Different letters and symbols, means statistic difference ($p < 0.05$) SD: Standard Deviation **G2**= ZrO₂/PEG [2 M], **G5**= ITO G6 = ITO + NaCl-0,9% treatment, **P1** = Hydrided surface by Cathodic polarization , **GC**= Control Group.*

Table 2. EDX quantitive analysis of the experimental coated Titanium surfaces.

Experimental Groups	Elements presented on coated titanium material (Ti-U e Na-Sc)								
	Percentages (%)								
	TiO ₂	ZrO ₂	SO ₃	P ₂ O ₅	CaO	CuO	K ₂ O	In ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃
G2	72.54	0.045	18.70	2.14	3				
G5	73.04	-	24.15	1.61	0.09	0.02	0.97	0.16	-
G6	72.67	-	24.80	1.39	0.08	0.02	0.95	0.10	-
P1	67.59	-	31.00	1.28	0.10	0.02	-	-	0.01

G2= ZrO₂/PEG [2 M], **G5**= ITO G6 = ITO + NaCl-0,9% treatment, **P1** = Hydrided surface by Cathodic polarization, **GC**= Control Group.

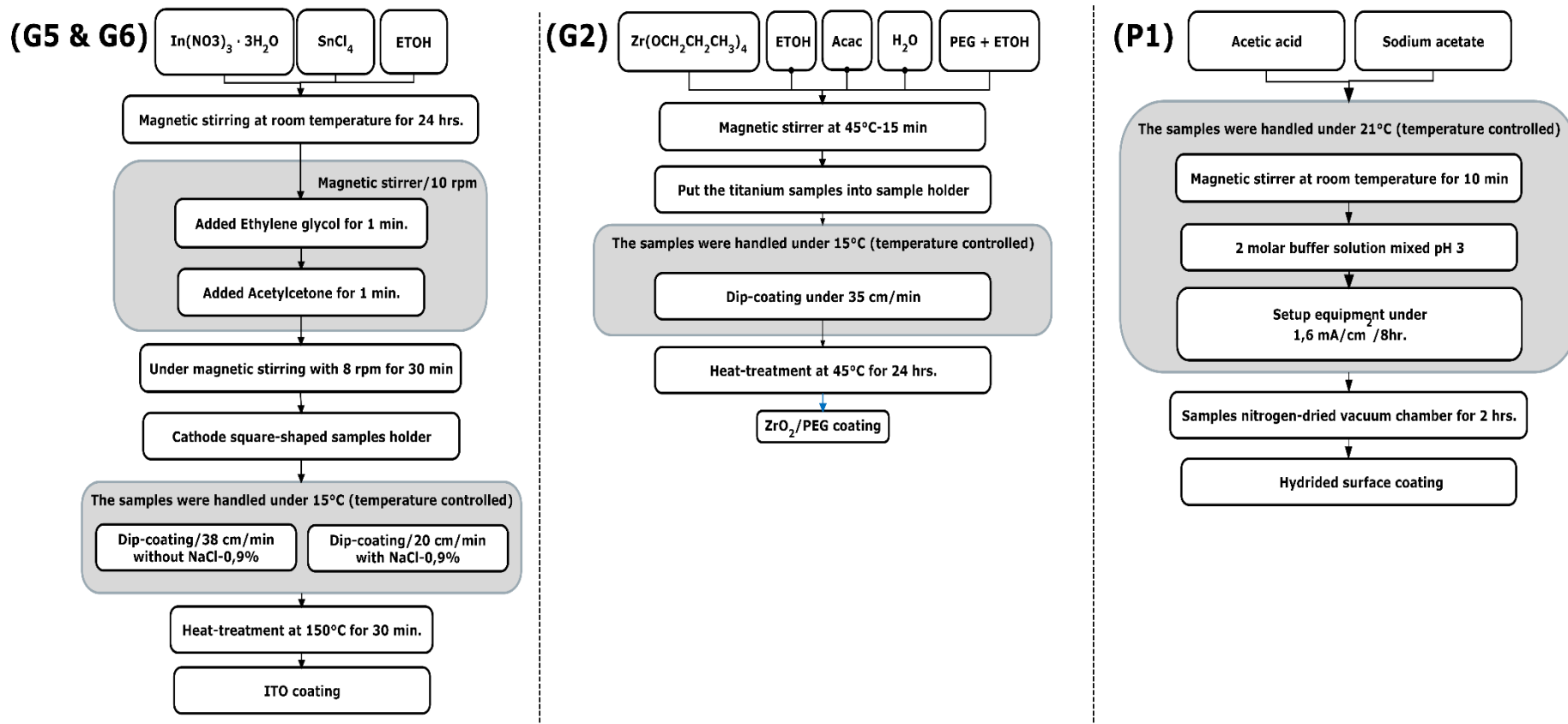


Figure 1 Flow chart of ITO and ZrO_2 /PEG coated synthesized by sol-gel Dip-coated and hydride by Cathodic Polarization.

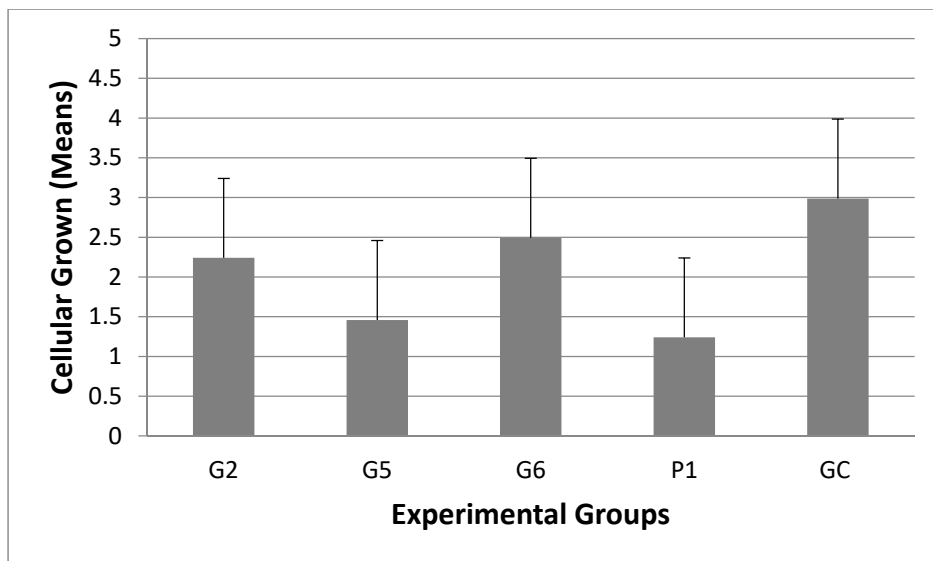


Figure 2. Cell viability of the experimental Titanium modified surfaces by sol-gel dip coating method and different sol solutions (G2, G5, G6) and cathodic electrochemical polarization (P1) and the control group (GC).

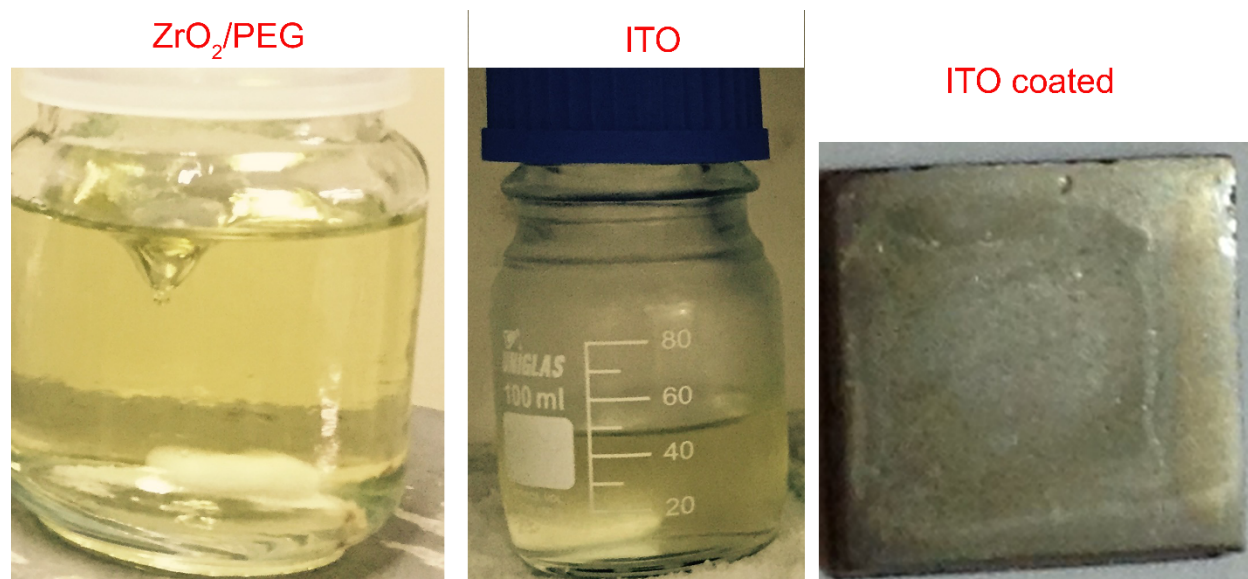


Figure 3. A. Sol of ITO, B. Sol of ZrO_2/PEG [2 M] C. Titanium after dip coating method with ITO

8 Conclusões

Ainda não existe consenso sobre o material ideal na indústria biomédica para a fabricação de dispositivos protéticos e ortopédicos em particular dentários dentro da área da odontologia. Entretanto, o Titânio (Ti) e suas ligas, apesar das taxas de rejeição reportadas, representam hoje em dia o padrão-ouro para a produção de dispositivos biomédicos. Melhora da eficácia clínica desses dispositivos biomédicos, com o intuito de induzir um comportamento bioativo e melhora da osseointegração nos locais onde os dispositivos implantáveis estão sendo aplicados para reconstruir os tecidos degradados são necessárias. Neste contexto, a principal estratégia para aprimorar a interação células/superfície de dispositivos biomédicos é a incorporação de sistemas de redes híbridas orgânicas-inorgânicas nas superfícies destes dispositivos protéticos e ortopédicos através da inovação nas técnicas de revestimento e outras técnicas de modificação de superfície, para tornar a composição química do material, mais compatível e parecido ao tecido ósseo.

O presente estudo permitiu confirmar mediante revisão sistemática que o uso da técnica electroquímica de polarização catódica aumenta a viabilidade celular e promove crescimento e diferenciação óssea.

Na realização do trabalho experimental, foi confirmada as nossas hipóteses. Os nanocompósitos de sistemas híbridos dopados e não dopados de ZrO_2/PEG , TiO_2/PEG , $\text{TiO}_2:\text{Li}^+$, ZrO_2/PEG , $\text{TiO}_2:\text{Li}^+/\text{PEG}$, ITO, Ácido acético-Acetato de sódio que foram sintetizadas e/ou depositados ou tratadas através da metodologia de sol-gel dip-coating e eletroquímica, demonstraram ser biocompatíveis e proporcionar uma microestrutura adequadas nas superfícies para proliferação e diferenciação celular. Este resultado nos permite vislumbrar a confecção e combinação de técnicas-metodologias de outros sistemas híbridos baseados em polímeros e a dopagem com óxidos de metais de transição, que possam ser utilizados em futuras aplicações para o desenvolvimento de superfícies biomiméticas na indústria biomédica.

Referências

- ÄÄRITALO, V.; MERETOJA, V.; TIRRI, T.; AREVA, S.; JÄMSÄ, T.; TUUKKANEN, J.; ROSLING, A.; NÄRHI, T. Development of a Low Temperature Sol-Gel-Derived Titania-Silica Implant Coating. **Materials Sciences and Applications**, v.1, n.3, 2010.
- AI-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **Journal of Dental Research**, v.87 n.2, p. 107-108, 2008.
- AKSAKAL, B.; HANYALOGLU, C. Bioceramic dip-coating on Ti-6Al-4V and 316L SS implant materials. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.19, n.5, p.2097-2104, 2008.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v.10 n.2 ,p. 96-101, 2001.
- ALCAZAR, J. C. B.; SALAS, M. M. S.; CONDE, M. C. M.; CHISINI, L. A.; DEMARCO, F. F.; TARQUINIO, S. B. C.; CARREÑO, N. L. V. Electrochemical Cathodic Polarization, a Simplified Method That Can Modified and Increase the Biological Activity of Titanium Surfaces: A Systematic Review. **PLoS One**, v.11, n.7, p.155-231, 2016.
- ALGHAMDI, H. S.; JANSEN, J. A. Bone regeneration associated with nontherapeutic and therapeutic surface coatings for dental implants in osteoporosis. **Tissue engineering. Part B Reviews**, v.19, n.3, p.233-253, 2013.
- ALI, S.; FAROOQ, I.; IQBAL, K. A review of the effect of various ions on the properties and the clinical applications of novel bioactive glasses in medicine and dentistry. **Saudi Dental Journal**, v.26, n.1, p.1-5, 2014.
- ALLYSON, I.; STEVEN, M. K.; WILLIAM, K.; PRIYANKA, S.; RYAN, S.; ANDRE VAN, O.; RAJESH, B.; RAYMOND, R.; TODD, L.; KARIN, B.-J.; JORGE, I. In Vivo Deformation, Surface Damage, and Biostability of Retrieved Dynesys Systems. **Spine**, v.5 , n.23, p. E1310-E1316, 2010.

ALSAADI, G.; QUIRYNEN, M.; KOMÁREK, A. Impact of local and systemic factors on the incidence of late oral implant loss. **Clinical Oral Implants**, v.19, n.7, p. 670-676, 2008.

AMIRI, B.; GHOLLASI, M.; SHAHROUSVAND, M.; KAMALI, M.; SALIMI, A. Osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells on modified PES-PEG electrospun fibrous composites loaded with Zn₂SiO₄ bioceramic nanoparticles. **Differentiation**, v.92, n.4, p.148-158, 2016.

ANSELME, K.; BIGERELLE, M.; NOEL, B.; DUFRESNE, E.; JUDAS, D.; IOST, A.; HARDOUIN, P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.49, n.2, p.155-166, 2000.

AOYAGI, S.; INOUE, M.; MITSUOKA, T. The effect of thin oxide film on protein sample measurement with TOF-SIMS. **Surface and Interface Analysis**, v.43, n.1-2, p.272-276, 2011.

AUBLIN, J. E. Bone stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.72, n.30-31, p.73-82, 1999.

AWS, A.; RUPERT, A.; SERPIL, D. Contemporary management of tooth replacement in the traumatized dentition. **Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology**, v.28, n.3, p.183-192, 2012.

BAIER, R. E.; MEYER, A. E. Implant surface preparation. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.3, n.1, 1988.

BALAMURUGAN, A.; BALOSSIER, G.; KANNAN, S.; RAJESWARI, S. Elaboration of sol-gel derived apatite films on surgical grade stainless steel for biomedical applications. **Materials Letters**, v.60, p. 2288-2293, 2006.

BALAZIC, M.; KOPAC, J.; JACKSON, M. J.; AHMED, W. Review: titanium and titanium alloy applications in medicine. **International Journal of Nano and Biomaterials**, v.1, n.1, p.3-34, 2007.

BAN, S.; MARUNO, S.; ARIMOTO, N.; HARADA, A.; HASEGAWA, J. Effect of electrochemically deposited apatite coating on bonding of bone to the HA-G-Ti

composite and titanium. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.36, n.1, p.9-15, 1997.

BARRÈRE, F.; MAHMOOD, T. A.; DE GROOT, K.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v.59, n.1–6, p.38-71, 2008.

BÄUERLE, D. **Laser Processing and Chemistry**. 1^o Ed., Springer, 2000.

BECKER, S. T.; BECK-BROICHSITTER, B. E.; ROSSMANN, C. M.; BEHRENS, E.; JOCHENS, A.; WILTFANG, J. Long-term Survival of Straumann Dental Implants with TPS Surfaces: A Retrospective Study with a Follow-up of 12 to 23 Years. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, 2015.

BEPPU, K.; KIDO, H.; WATAZU, A.; TERAOKA, K. Peri-Implant Bone Density in Senile Osteoporosis-Changes from Implant Placement to Osseointegration. **Implant dentistry**, v.15, n. 2, p.217-226, 2011.

BERNHARD, S.; MARIA, B.; MARC, C. M.; RALF, J. K. The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. **Biomaterials**, v.30, n.6, p. 979-990, 2009.

BORN, R.; SCHARNWEBER, D.; RÖßLER, S.; STÖLZEL, M.; THIEME, M.; WOLF, C.; WORCH, H. Surface analysis of titanium based biomaterials **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.361, n.6-7, p.697-700, 1998.

BOWEN, W. R.; HILAL, N. **Atomic force microscopy in process engineering: an introduction to AFM for improved processes and products**. 1^o Ed., Elsevier, 2009.

BOYAN, B. D.; BATZER, R.; KIESWETTER, K.; LIU, Y.; COCHRAN, D. L.; SZMUCKLER-MONCLER, S.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 α ,25-(OH)₂D₃ **Journal of Biomedical Materials Research**, v.39, n.1, p.77-85, 1998.

BOYER, R. R. Titanium for aerospace: Rationale and applications **Advanced Performance Materials**, v.2, 1995.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing**. Academic press, 1^oEd., Elsevier, 1989.

BRUNETTE, D. M. **Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications.** Springer, 2001.

BUCHANAN, R. A.; LEE, I. S.; WILLIAMS, J. M. Surface modification of biomaterials through noble metal ion implantation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.24, n.3, p.309-318, 1990.

BUSER, D.; SCHENK, R. K.; STEINEMANN, 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. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.25, n.7, p.889-902, 1991.

CALLISTER, W. D. **Materials Science And Engineering: An Introduction.** John Wiley & Sons, 2007.

CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F. Biocompatibility improvement of titanium implants by coating with hybrid materials synthesized by sol-gel technique. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.102, n.12, p.4473-4479, 2014.

CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F. Biocompatibility improvement of titanium implants by coating with hybrid materials synthesized by sol-gel technique. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.102, n.12, p.4473-4479, 2014.

CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F. Preparation, characterization, and biological properties of organic-inorganic nanocomposite coatings on titanium substrates prepared by sol-gel. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.102, n.2, p.392-399, 2014.

CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F. Synthesis of SiO₂ system via sol-gel process: biocompatibility tests with a fibroblast strain and release kinetics. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.102, n.6, p.1677-1680, 2014.

CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F.; MARCIANO, S.; PACIFICO, S. TiO₂/PCL hybrid materials synthesized via sol-gel technique for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: Part C**, v.47, p.135-141, 2015.

CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F.; MOZETIC, P.; RAINER, A.; TROMBETTA, M. Biological response of human mesenchymal stromal cells to titanium grade 4

implants coated with PCL/ZrO₂ hybrid materials synthesized by sol–gel route: in vitro evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, v.45, p.395-401, 2014.

CATAURO, M.; BOLLINO, F.; VERONESI, P.; LAMANNA, G. Influence of PCL on mechanical properties and bioactivity of ZrO₂-based hybrid coatings synthesized by sol–gel dip coating technique. **Materials Science and Engineering: C**, v.39, p.344-351, 2014.

CATAURO, M.; PAPALE, F.; BOLLINO, F. Characterization and biological properties of TiO₂/PCL hybrid layers prepared via sol–gel dip coating for surface modification of titanium implants **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.415, p.9-15, 2015.

CHEN, G. F.; WEN, X. J.; ZHANG, N. Corrosion resistance and ion dissolution of titanium with different surface microroughness. **Biomedical Materials and Engineering**, v.8, n.2, p.61-74, 1998.

CHEN, Q.; ZHU, C.; THOUAS, G. A. Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. **Progress in Biomaterials**, v.1, n.1, p.2, 2012.

CHENG, H.-C.; LEE, S.-Y.; CHEN, C.-C.; SHYNG, Y.-C.; OU, K.-L. Titanium nanostructural surface processing for improved biocompatibility. **Applied Physics Letters**, v.89, n.17, 2006.

CHIH-YAO, C.; SHIH-HWA, C.; WEI-EN, Y.; MING-LUN, H.; MING-CHI, Y.; MING-LONG, T.; LI-KAI, C.; HER-HSIUNG, H. Formation of TiO₂ nano-network on titanium surface increases the human cell growth. **Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials**, 2009.

CHOI, A. H.; BEN-NISSAN, B. Sol-gel production of bioactive nanocoatings for medical applications. Part II: current research and development. **Nanomedicine (London, England)**, v.2, n.1, p.51-61, 2007.

CHOI, J.-M.; KIM, H.-E.; LEE, I.-S. Ion-beam-assisted deposition (IBAD) of hydroxyapatite coating layer on Ti-based metal substrate. **Biomaterials**, v.21, n.5, p.469-473, 2000.

CLÉMENT-LACROIX, P.; AI, M.; MORVAN, F.; ROMAN-ROMAN, S.; VAYSSIÈRE, B.; BELLEVILLE, C.; ESTRERA, K.; WARMAN, M. L.; BARON, R.; RAWADI, G. Lrp5-

independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.48, p.17406-17411, 2005.

CORREA, M. B.; PERES, M. A.; PERES, K. G.; HORTA, B. L.; GIGANTE, D. P.; DEMARCO, F. F. Life-course determinants of need for dental prostheses at age 24. **Journal of dental research**, 2010.

DADSETAN, M.; GIULIANI, M.; WANIVENHAUS, F.; BRETT RUNGE, M.; CHARLESWORTH, J. E.; YASZEMSKI, M. J. Incorporation of phosphate group modulates bone cell attachment and differentiation on oligo(polyethylene glycol) fumarate hydrogel. **Acta Biomaterialia**, v.8, n.4, p.1430-1439, 2012.

DAHLIN, C.; JOHANSSON, A.; HOFFMAN, M.; MOLENBERG, A. Early biocompatibility of poly (ethylene glycol) hydrogel barrier materials for guided bone regeneration. An in vitro study using human gingival fibroblasts (HGF-1). **Clinical Oral Implants Research**, v.25, n.1, p.16-20, 2014.

DAVID, M. D. E.; PAULO, G. C.; BYUNG-SOO, K.; YOUNG-TAEG, S.; TOMAS, A. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. **Trends in biotechnology**, v.28, n.4, p. 198-206, 2010.

DAVID, W. P.; NADINE, B.; RAY, C. W. Risk Factors for Endosseous Dental Implant Failure. **Dental clinics of North America**, v.50, n.3, p.361-374, 2006.

DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**, v.67, n.8, p.932-949, 2003.

DE BOER, J.; SIDDAPPA, R.; GASPAR, C.; VAN APELDOORN, A.; FODDE, R.; VAN BLITTERSWIJK, C. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Bone**, v.34, n.5, p.818-826,

DE GIGLIO, E.; COMETA, S.; CALVANO, C. D.; SABBATINI, L.; ZAMBONIN, P. G.; COLUCCI, S.; BENEDETTO, A. D.; COLAIANNI, G. A new titanium biofunctionalized interface based on poly(pyrrole-3-acetic acid) coating: proliferation of osteoblast-like cells and future perspectives. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.18, n.9, p.1781-1789, 2007.

DE JONGE, L.; LEEUWENBURGH, S.; WOLKE, J.; JANSEN, J. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. **Pharmaceutical research**, v.25, n.10, p.2357-2369, 2008.

DE WILD, M.; SCHUMACHER, R.; MAYER, K.; SCHKOMMODAU, E.; THOMA, D.; BREDELL, M.; KRUSE GUJER, A.; GRÄTZ, K. W.; WEBER, F. E. Bone regeneration by the osteoconductivity of porous titanium implants manufactured by selective laser melting: a histological and micro computed tomography study in the rabbit. **Tissue engineering. Part A**, v.19, n.23-24, p.2645-2654, 2013.

DIEUDONNÉ, S. C.; VAN DEN DOLDER, J.; DE RUIJTER, J. E.; PALDAN, H.; PELTOLA, T.; VAN 'T HOF, M. A.; HAPPONEN, R. P.; JANSEN, J. A. Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. **Biomaterials**, v.23, n.14, p.3041-3051, 2002.

DONARUMA, L. G. Definitions in biomaterials, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, 72 pp **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters**, v.26, n.9, p.414-414, 1988.

DVORAK, G.; ARNHART, C.; HEUBERER, S. Peri-implantitis and late implant failures in postmenopausal women: a cross-sectional study. **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, n.10, p. 950-955, 2011.

EASTOE, J. E. Chemical aspects of the matrix concept in calcified tissue organisation **Calcified tissue research**, v. 2, n.1, p. 1-19, 1968.

ELEFThERIOS, T.; NEIL, U.; PETER, G. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?. **Injury**, v.38, suppl. 1, p. S11-25, 2007.

ELENI, D. R. The social solution-denture esthetics, phonetics, and function. **Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists**, v.18, p. 112-115, 2009.

ELLINGSEN, J. E.; THOMSEN, P.; LYGSTADAAS, S. P. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. **Periodontology 2000**, v.41, n.1, p.136-156, 2006.

EMAMI, E.; DE SOUZA, R. F.; KABAWAT, M.; FEINE, J. S. The impact of edentulism on oral and general health. **International journal of dentistry**, v.2013, p.498305, 2012.

FABBRO, M.; TESTORI, T.; FRANCETTI, L.; WEINSTEIN, R. Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. **The Journal of prosthetic dentistry**, v.94, n.3, p.266, 2005.

FARIA, A. C.; ROSA, A. L.; RODRIGUES, R. C.; RIBEIRO, R. F. In vitro cytotoxicity of dental alloys and cpTi obtained by casting. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.85, n.2, p.504-508, 2008.

FERRARIS, S.; SPRIANO, S.; PAN, G.; VENTURELLO, A.; BIANCHI, C. L.; CHIESA, R.; FAGA, M. G.; MAINA, G.; VERNÈ, E. Surface modification of Ti-6Al-4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.22, n.3, p.533-545, 2011.

FIGUEIRA, R. B.; SILVA, C. J. R.; PEREIRA, E. V. Organic-inorganic hybrid sol-gel coatings for metal corrosion protection: a review of recent progress. **Journal of Coatings Technology and Research**, v.12, n.1, p.1-35, 2015.

FOROUTAN, F.; DE LEEUW, N. H.; MARTIN, R. A.; PALMER, G.; OWENS, G. J.; KIM, H.-W.; KNOWLES, J. C. Novel sol-gel preparation of $(P_2O_5)_{0.4}-(CaO)_{0.25}-(Na_2O)_X-(TiO_2)_{(0.35-X)}$ bioresorbable glasses ($X = 0.05, 0.1, \text{ and } 0.15$). **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v.73, n.2, p.434-442, 2015.

FRANK, M. J.; WALTER, M. S.; BUCKO, M. M.; PAMULA, E.; LYGSTADAAS, S. P.; HAUGEN, H. J. Polarization of modified titanium and titanium-zirconium creates nanostructures while hydride formation is modulated. **Applied Surface Science**, v.282, p.7-16, 2013.

FRANK, M. J.; WALTER, M. S.; RUBERT, M.; THIEDE, B.; MONJO, M.; RESELAND, J. E.; HAUGEN, H. J.; LYGSTADAAS, S. P. Cathodic Polarization Coats Titanium Based Implant Materials with Enamel Matrix Derivate (EMD). **Materials**, v.7, n.3, p.2210-2228, 2014.

GALLI, C.; PASSERI, G.; RAVANETTI, F.; ELEZI, E.; PEDRAZZONI, M.; MACALUSO, G. M. Rough surface topography enhances the activation of Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.95A, n.3, p.682-690, 2010.

GALLI, C.; PIEMONTESE, M.; LUMETTI, S.; MANFREDI, E.; MACALUSO, G. M.; PASSERI, G. GSK3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical

signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces. **Clinical Oral Implants Research**, v.24, n.8, p.921-927, 2013.

GAMONAL, J. A.; LOPEZ, N. J.; ARANDA, W. Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile. **International Dental Journal**, 1998.

GAO, X.; WACHS, I. E. Titania–silica as catalysts: molecular structural characteristics and physico-chemical properties. **Catalysis Today**, v.51, n.2, p.233-254, 1999.

GASIK, M.; BRAEM, A.; CHAUDHARI, A.; DUYCK, J.; VLEUGELS, J. Titanium implants with modified surfaces: Meta-analysis of in vivo osseointegration. **Materials Science and Engineering: C**, v.49, p.152-158, 2015.

GEETHA, M.; SINGH, A. K.; ASOKAMANI, R.; GOGIA, A. K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review. **Progress in Materials**, v.54, n.3, p.397-425, 2009.

GENTILI, C.; CANCEDDA, R. Cartilage and bone extracellular matrix. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, n.12, p.1334-1348, 2009.

GHADA, A.; MARC, Q.; KATLEEN, M.; WIM, T.; ARNOŠT, K.; DANIEL VAN, S. Impact of local and systemic factors on the incidence of failures up to abutment connection with modified surface oral implants. **Journal of Clinical Periodontology**, 2008.

GITTENS, R.; SCHEIDELER, L.; RUPP, F.; HYZY, S.; GEIS-GERSTORFER, J.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. **Acta biomaterialia**, 2014.

GLADIUS, L. Properties of open-cell porous metals and alloys for orthopaedic applications. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v.24, n.10, p. 2293-2325, 2013.

GOLDSTEIN, J. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis: Third Edition**. Springer US, 2003.

GOMEZ-FLORIT, M.; XING, R.; RAMIS, J. M.; TAXT-LAMOLLE, S.; HAUGEN, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; MONJO, M. Human gingival fibroblasts function is stimulated

on machined hydrided titanium zirconium dental implants. **Journal of Dentistry**,v.42, n.1, p.30-38, 2014.

GOTO, T. Osseointegration and dental implants. **Clinical Calcium**, v.24, n.2, p.265-271, 2014.

GOULD, T. D.; MANJI, H. K. The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. **Neuroscientist**, v.8, n.5, p.497-511, 2002.

GRASSI, S.; PIATTELLI, A.; DE FIGUEIREDO, L.; FERES, M.; DE MELO, L.; IEZZI, G.; ALBA, R.; SHIBLI, J. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. **Journal of Periodontology**,v.77, n.10, p.1736-1743, 2006.

GUIDO, H.; DAVID, L.; MANAL, A. A.; JAMES, P. L.; JOCELYNE, S. F. Oral and general health-related quality of life with conventional and implant dentures. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, 2003.

GUPTA, R.; CHAUDHURY, N. K. Entrapment of biomolecules in sol–gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. **Biosensors and Bioelectronics**, 2007.

GUPTA, R.; KUMAR, A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v.3, n.3, p.34005, 2008.

H. PODBIELSKA, A. U.-J. Z. Sol-gel technology for biomedical engineering. **Bulletin of the Polish Academy Of Sciences**, v.54, n.3, 2005.

HADDOW, D. B.; KOTHARI, S.; JAMES, P. F.; SHORT, R. D.; HATTON, P. V.; VAN NOORT, R. Synthetic implant surfaces. 1. The formation and characterization of sol-gel titania films **Biomaterials**, v.17, n.5, p.501-507, 1996.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone Remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2006.

HAMPDEN-SMITH, M. J.; KODAS, T. T. Chemical vapor deposition of metals: Part 2. Overview of selective CVD of Metals. **Chemical Vapor Deposition**, v.1, n.2, p.39-48, 1995.

HAN, P.; WU, C.; CHANG, J.; XIAO, Y. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/ β -catenin signalling pathway by Li⁺ ions released from bioactive scaffolds. **Biomaterials**, v.33, n.27, p.6370-6379, 2012.

HAYES, J. S.; RICHARDS, R. G. Surfaces to control tissue adhesion for osteosynthesis with metal implants: in vitro and in vivo studies to bring solutions to the patient. **Expert Review of Medical Devices**, v.7, n.1, p.131-142, 2010.

HAYES, J. S.; RICHARDS, R. G. The use of titanium and stainless steel in fracture fixation **Expert Review of Medical Devices**, v.7, n.6, p.843-853, 2010.

HENCH, L. L.; ETHRIDGE, E. C. **Biomaterials: An Interfacial Approach**. Acad. Press, 1982.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. World Scientific, 1998.

HERRMANN, I.; LEKHOLM, U.; HOLM, S.; KULTJE, C. Evaluation of patient and implant characteristics as potential prognostic factors for oral implant failures. **Internatin Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.20, n.2, p.220-230, 2005.

HEYDECKE, G.; KOHAL, R.; GLÄSER, R. Optimal esthetics in single-tooth replacement with the Re-Implant system: a case report. **International Journal of Prosthodontics**, v.12, n.2, 1999.

HIROMOTO, S.; HANAWA, T.; ASAMI, K. Composition of surface oxide film of titanium with culturing murine fibroblasts L929. **Biomaterials**, v.25, n.6, p.979-986, 2004.

HOSAKA, M.; SHIBATA, Y.; MIYAZAKI, T. Preliminary beta-tricalcium phosphate coating prepared by discharging in a modified body fluid enhances collagen immobilization onto titanium. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, v.78B, n.2, p.237-242, 2006.

HUANG, Y.; HAN, S.; PANG, X.; DING, Q.; YAN, Y. Electrodeposition of porous hydroxyapatite/calcium silicate composite coating on titanium for biomedical applications. **Applied Surface Science**, v.271, n.0, p.299-302, 2013.

INES, P.; MARTIN, S.; FRAUKE, M.; REINER, B. Edentulism as part of the general health problems of elderly adults. **International Dental Journal**, v. 60, n. 3, p. 143-155, 2010.

JANSEN, J.; WOLKE, J.; SWANN, S.; VAN DER WAERDEN, J.; DE GROOF, K. Application of magnetron sputtering for producing ceramic coatings on implant materials. **Clinical Oral Implants Research**, v.4, n.1, p.28-34, 1993.

JEFFCOAT, M. The association between osteoporosis and oral bone loss. **Journal of Periodontology**, v.76, n.11 Suppl, p.2125-2132, 2005.

JIN, C.; REN, L.-F. F.; DING, H.-Z. Z.; SHI, G.-S. S.; LIN, H.-S. S.; ZHANG, F. Enhanced attachment, proliferation, and differentiation of human gingival fibroblasts on titanium surface modified with biomolecules. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.100, n.8, p.2167-2177, 2012.

JOHN, D. C. Bone architecture and fracture. **Current Osteoporosis Reports**, v.3, p.52-55, 2005.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, v.9, n.1, p.4457-4486, 2013.

JUDEINSTEIN, P.; SANCHEZ, C. Hybrid organic-inorganic materials: a land of multidisciplinary. **Journal of Materials Chemistry**, v.6, n.4, p.511-525, 1996.

JUDEINSTEIN, P.; SCHMIDT, H. K.; TITMAN, J.; STAMM, M. Investigation of ion-conducting polymers: structure-property relationships. **Chemistry of Materials**, v.6, n.2, p. 127-134, 1994.

JUNG, U. W.; HWANG, J. W.; CHOI, D. Y.; HU, K. S.; KWON, M. K.; CHOI, S. H.; KIM, H. J. Surface characteristics of a novel hydroxyapatite-coated dental implant. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v.42, n.2, p.59-63, 2012.

JUNG, Y. C.; HAN, C. H.; LEE, I. S.; KIM, H. E. Effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the osseointegration of endosseous implants in rabbit tibiae. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.16, n.6, p.809-818, 2001.

KASEMO, B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. **The Journal of prosthetic dentistry**, v.49, n.6, p.832-837, 1983.

KAUS, T.; PRÖBSTER, L.; WEBER, H. Clinical follow-up study of ceramic veneered titanium restorations--three-year results. **The International journal of prosthodontics**, v.9, n.1, p.9-15, 1996.

KHAN, K. S.; KUNZ, R. Five steps to conducting a systematic review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.96, n.3, p.118-121, 2003.

KHORAMI, M.; HESARAKI, S.; BEHNAMGHADER, A.; NAZARIAN, H.; SHAHRABI, S. In vitro bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass. **Materials Science and Engineering: C**, v.31, n.7, p.1584-1592, 2011.

KIM, K.-H.; RAMASWAMY, N. Electrochemical surface modification of titanium in dentistry. **Dental Material Journal**, v.28, n.1, p.20-36, 2009.

KOHLES, S. S.; CLARK, M. B.; BROWN, C. A.; KENEALY, J. N. Direct assessment of profilometric roughness variability from typical implant surface types. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.19, n.4, 2004.

KOLLER, G.; COOK, R. J.; THOMPSON, I. D.; WATSON, T. F.; DI SILVIO, L. Surface modification of titanium implants using bioactive glasses with air abrasion technologies. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.18, n.12, p.2291-2296, 2007.

KULKARNI, M.; MAZARE, A.; SCHMUKI, P.; IGLIČ, A. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. **Nanomedicine**, v.5, p.112-130, 2014.

LAMOLLE, S. F.; MONJO, M.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; HAUGEN, H. J. Titanium implant surface modification by cathodic reduction in hydrofluoric acid: surface characterization and in vivo performance. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.88, n.3, p.581-588, 2009.

LE GUÉHENNEC, L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental materials**, v.23, n.7, p.844-854, 2007.

LEV, O.; SAMPATH, S. **Sol-gel electrochemistry**. CRC Press, 2010.

LEWANDOWSKI, Z.; BEYENAL, H. **Fundamentals of Biofilm Research, Second Edition**. Taylor & Francis, 2013.

LI, P.; KANGASNIEMI, I.; DE GROOT, K.; KOKUBO, T. Bonelike Hydroxyapatite Induction by a Gel-Derived Titania on a Titanium Substrate. **Journal of the American Ceramic Society**, v.77, n.5, p.1307-1312, 1994.

LIANG, Y.; LI, H.; XU, J.; LI, X.; QI, M.; HU, M. Morphology, composition, and bioactivity of strontium-doped brushite coatings deposited on titanium implants via electrochemical deposition. **International Journal of Molecular Science**, v.15, n.6, p.9952-9962, 2014.

LILJA, M.; GENVAD, A.; ASTRAND, M.; STRØMME, M.; ENQVIST, H. Influence of microstructure and chemical composition of sputter deposited TiO₂ thin films on in vitro bioactivity. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v.22, n.12, p.2727-2734, 2011.

LIMIN, S.; CHRISTOPHER, C. B.; KARLIS, A. G.; AHMET, K. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.58, n.5, p.570-592, 2001.

LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v.47, n.3, p.49-121, 2004.

LIU, X.; LIM, J. Y.; DONAHUE, H. J.; DHURJATI, R.; MASTRO, A. M.; VOGLER, E. A. Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro. **Biomaterials**, v.28, n.31, p.4535-4550, 2007.

MA, M.; YE, W.; WANG, X.-X. Effect of supersaturation on the morphology of hydroxyapatite crystals deposited by electrochemical deposition on titanium. **Materials Letters**, v.62, n.23, p.3875-3877, 2008.

MALHI, G. S.; TANIOUS, M.; DAS, P.; BERK, M. The science and practice of lithium therapy. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v.46, n.3, p.192-211, 2012.

MARKHOFF, J.; MICK, E.; MITROVIC, A.; PASOLD, J.; WEGNER, K.; BADER, R. Surface Modifications of Dental Ceramic Implants with Different Glass Solder Matrices: In Vitro Analyses with Human Primary Osteoblasts and Epithelial Cells. **Biomed Research International**, v.2014, p.7, 2014.

MARKS, S. C., JR.; POPOFF, S. N. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. **The American Journal of Anatomy**, v.183, n.1, p.1-44, 1988.

MARY, L. B. Bone quality: where do we go from here?. **Osteoporosis International**, v.14, n.5, p.118-127, 2003.

MASSARO, C.; ROTOLO, P.; DE RICCARDIS, F.; MILELLA, E.; NAPOLI, A.; WIELAND, M.; TEXTOR, M.; SPENCER, N. D.; BRUNETTE, D. M. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.13, n.6, p.535-548, 2002.

MATSUI, Y.; OHNO, K.; MICHI, K.-I.; YAMAGATA, K. Experimental Study of High-Velocity Flame-Sprayed Hydroxyapatite Coated and Noncoated Titanium Implants. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.9, n.4, 1994.

MAURER, A. M.; MERRITT, K.; BROWN, S. A. Cellular uptake of titanium and vanadium from addition of salts or fretting corrosion in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.28, n.2, p.241-246, 1994.

MCCAFFERTY, E. **Introduction to Corrosion Science**. Springer New York, 2010.

MCINTIRE, L. V.; CENTER, W. T. E. **WTEC Panel on Tissue Engineering Research: Final Report**. Academic Press, 2003.

MILLER, S. C.; JEE, W. S. The bone lining cell: a distinct phenotype?. **Calcified tissue international**, v.41, p.1-5, 1987.

MOHAMMED, M. T.; KHAN, Z. A.; SIDDIQUEE, A. N. Surface Modifications of Titanium Materials for developing Corrosion Behavior in Human Body Environment: A Review. **Procedia Materials Science**, v.6, p.1610-1618, 2014.

MOHSENI, E.; ZALNEZHAD, E.; BUSHROA, A. R. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: A review paper. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v.48, p.238-257, 2014.

MOZAFARI, M.; SALAHINEJAD, E.; SHABAFROOZ, V.; YAZDIMAMAGHANI, M.; VASHAEE, D.; TAYEBI, L. Multilayer bioactive glass/zirconium titanate thin films in bone tissue engineering and regenerative dentistry. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p.1665-1672, 2013.

MUELLER, K. F.; BRIEL, M.; STRECH, D.; MEERPOHL, J. J.; LANG, B.; MOTSCHALL, E.; GLOY, V.; LAMONTAGNE, F.; BASSLER, D. Dissemination bias in systematic reviews of animal research: a systematic review. **PLoS One**, v.9, n.12, p.e116016, 2014.

NADDEO, P.; LAINO, L.; LA NOCE, M.; PIATTELLI, A.; DE ROSA, A.; IEZZI, G.; LAINO, G.; PAINO, F.; PAPACCIO, G.; TIRINO, V. Surface biocompatibility of differently textured titanium implants with mesenchymal stem cells. **Dental Materials**, v.31, n.3, p.235-243, 2015.

NARAYANAN, R.; KWON, T. Y.; KIM, K. H. Preparation and characteristics of nano-grained calcium phosphate coatings on titanium from ultrasonated bath at acidic pH. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.85, n.1, p.231-239, 2008.

NARAYANAN, R.; SESHADRI, S. K.; KWON, T. Y.; KIM, K. H. Electrochemical nano-grained calcium phosphate coatings on Ti-6Al-4V for biomaterial applications. **Scripta Materialia**, v.56, n.3, p.229-232, 2007.

NIINOMI, M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v.1, n.1, p.30-42, 2008.

NOORT, R. V. **Introduction to Dental Materials**. 4 Edition.ed. MOSBY Elsevier, 2013.

OLIVARES-NAVARRETE, R.; HYZY, S. L.; HUTTON, D. L.; DUNN, G. R.; APPERT, C.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z. Role of non-canonical Wnt signaling in osteoblast maturation on microstructured titanium surfaces. **Acta Biomaterialia**, v.7, n.6, p.2740-2750, 2011.

OSHIDA, Y. **Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials**. Elsevier, 2006.

OU, K.-L.; LIN, C.-T.; CHEN, S.-L.; HUANG, C.-F.; CHENG, H.-C.; YEH, Y.-M.; LIN, K.-H. Effect of multi-nano-titania film on proliferation and differentiation of mouse fibroblast cell on titanium. **Journal of the Electrochemical Society**, v.155, n.6, p.E79-E84, 2008.

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, 2016.

PACHAURI, P.; BATHALA, L. R.; SANGUR, R. Techniques for dental implant nanosurface modifications. **Journal of Advanced Prosthodontics**, v.6, n.6, p.498-504, 2014.

PARK, J. H.; SCHWARTZ, Z.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; BOYAN, B. D.; TANNENBAUM, R. Enhancement of surface wettability via the modification of microtextured titanium implant surfaces with polyelectrolytes. **Langmuir**, v.27, n.10, p.5976-5985, 2011.

PARR, G.; GARDNER, L.; TOTH, R. Titanium: the mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspects. **The Journal of prosthetic dentistry**, v.54, n.3, p.410-414, 1985.

PÄTTSI, M. E.; HAUTANIEMI, J. A.; RAHIALA, H. M.; PELTOLA, T. O.; KANGASNIEMI, I. M. O. Bonding Strengths of Titania Sol-Gel Derived Coatings on Titanium. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v.11, n.1, p.55-66, 1998.

PEARCE, A. I.; PEARCE, S. G.; SCHWIEGER, K.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; ARCHER, C. W.; RICHARDS, R. G. Effect of surface topography on removal of cortical bone screws in a novel sheep model. **Journal of Orthopaedic Research**, v.26, n.10, p.1377-1383, 2008.

PELTOLA, T.; PATSI, M.; RAHIALA, H.; KANGASNIEMI, I.; YLI-URPO, A. Calcium phosphate induction by sol-gel-derived titania coatings on titanium substrates in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.41, n.3, p.504-510, 1998.

PENG, P.; KUMAR, S.; VOELCKER, N. H.; SZILI, E.; SMART, R. S. C.; GRIESSER, H. J. Thin calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition in modified simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.76A, n.2, p.347-355, 2006.

PEREL, P.; ROBERTS, I.; SENA, E.; WHEBLE, P.; BRISCOE, C.; SANDERCOCK, P.; MACLEOD, M.; MIGNINI, L. E.; JAYARAM, P.; KHAN, K. S. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. **Bmj**, v.334, n.7586, p.197, 2007.

PETER, G.; SPYRIDON, P.; GEORGE, K. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. **Injury**, v. 38, n.1, p. 81-89, 2007.

PETERS, J. L.; SUTTON, A. J.; JONES, D. R.; RUSHTON, L.; ABRAMS, K. R. A systematic review of systematic reviews and meta-analyses of animal experiments with guidelines for reporting. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.41, n.7, p.1245-1258, 2006.

PETERSEN, P. E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.31 Suppl 1, p.3-23, 2003.

PETERSEN, P. E.; KANDELMAN, D.; ARPIN, S.; OGAWA, H. Global oral health of older people--call for public health action. **Community Dental Health**, v.27, n.4 Suppl 2, p.257-267, 2010.

PETERSEN, P. E.; YAMAMOTO, T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.33, n.2, p.81-92, 2005.

PHAN, T. C. A.; XU, J.; ZHENG, M. H. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. **Histology and Histopathology**, v.19, n.4, p. 325-442004.

PHILIP A. SCHWEITZER, P. E. **Fundamentals of Corrosion: Mechanisms, Causes, and Preventative Methods**. CRC Press, 2009.

PONZ, E.; LADAGA, J. L.; BONETTO, R. D. Measuring surface topography with scanning electron microscopy. I. EZEImage: a program to obtain 3D surface data. **Microscopy and Microanalysis**, v.12, n.2, p.170-177, 2006.

PRADO DA SILVA, M. H.; SOARES, G. D.; ELIAS, C. N.; BEST, S. M.; GIBSON, I. R.; DISILVIO, L.; DALBY, M. J. In vitro cellular response to titanium electrochemically coated with hydroxyapatite compared to titanium with three different levels of surface roughness. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.14, n.6, p.511-519, 2003.

PULEO, D. A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. **Biomaterials**, 1999.

QUIRYNEN, M.; VOGELS, R.; PEETERS, W.; VAN STEENBERGHE, D.; NAERT, I.; HAFFAJEE, A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. **Clinical Oral Implants Research**, v.17, n.1, p.25-37, 2006.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.33, p.25103-25108, 2010.

RAHAL, M. D.; BRANEMARK, P. I.; OSMOND, D. G. Response of bone marrow to titanium implants: osseointegration and the establishment of a bone marrow-titanium interface in mice. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.8, n.5, p.573-579, 1993.

RAIKAR, G. N. Surface characterization of titanium implants. **Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films**, v.13, 1995.

RAJWANT, S. B.; DEREK, E. B.; LAURA, P. Z.; YUSHAN, Y. Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants. **Acta biomaterialia**, 2009.

RAMIRES, P. A.; WENNERBERG, A.; JOHANSSON, C. B.; COSENTINO, F.; TUNDO, S.; MILELLA, E. Biological behavior of sol-gel coated dental implants. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.14, n.6, p.539-545, 2003.

RICHARDS, G. R.; MORIARTY, F. T.; MICLAU, T.; MCCLELLAN, R. T.; GRAINGER, D. W. Advances in Biomaterials and Surface Technologies. **Journal of orthopaedic trauma**, v.26, n.12, p.703, 2012.

ROCCHIETTA, I.; FONTANA, F.; ADDIS, A.; SCHUPBACH, P.; SIMION, M. Surface-modified zirconia implants: tissue response in rabbits. **Clinical Oral Implants Research**, v.20, n.8, p.844-850, 2009.

RODRIGUES, D.; BRENNAN, A.; BETRABET, C.; WANG, B.; WILKES, G. Structural features of sol-gel-derived hybrid inorganic-organic network ceramer materials by small-angle x-ray scattering. **Chemistry of Materials**, v.4, n.6, p.1437-1446, 1992.

ROHANIZADEH, R.; LEGEROS, R. Z.; HARSONO, M.; BENDAVID, A. Adherent apatite coating on titanium substrate using chemical deposition. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 72A, n. 4, p. 428-438, 2005.

SANCHEZ, C.; RIBOT, F.; ROZES, L.; ALONSO, B. Design of Hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites Synthesized Via Sol-Gel Chemistry. **Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v.354, n.1, p.143-158, 2000.

SANDSTROM, T.; STJERNBERG, N.; ANDERSSON, M. C.; KOLMODIN-HEDMAN, B.; LINDSTROM, K.; ROSENHALL, L. Cell response in bronchoalveolar lavage fluid after sulfur dioxide exposure. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, n.2, p.142-146, 1989.

SB, M. D. S. Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa nacional de saúde bucal revela importante redução da cárie dentária no país / National oral health survey in 2010 shows a major decrease in dental caries in Brazil. **Biblioteca Virtual em Saude**, v.27, n.1, p.4-5, 2012.

SCHELLER, E. L.; VILLA-DIAZ, L. G.; KREBSBACH, P. H. Gene therapy: implications for craniofacial regeneration. **The Journal of craniofacial surgery**, v.23, n.1, p.333-337, 2012.

SCHUTZ, R.; WATKINS, H. Recent developments in titanium alloy application in the energy industry. **Materials Science and Engineering: A**, v.243, n.1, p.305-315, 1998.

SCHWARTZ, J.; AVALTRONI, M. J.; DANAHY, M. P.; SILVERMAN, B. M.; HANSON, E. L.; SCHWARZBAUER, J. E.; MIDWOOD, K. S.; GAWALT, E. S. Cell attachment and spreading on metal implant materials. **Materials Science and Engineering: C**, v.23, n.3, p.395-400, 2003.

SELVAKUMARAN, J.; KEDDIE, J. L.; EWINS, D. J.; HUGHES, M. P. Protein adsorption on materials for recording sites on implantable microelectrodes. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.19, n.1, p.143-151, 2008.

SHAINBERG, A. P. M.; VALÉRIO, P.; ZONARI, A.; OKTAR, F. N.; OZYEGIN, L. S.; GRAÇA, M. P. F.; LEITE, M. F.; GOES, A. M. Attachment and Proliferation of Osteoblasts on Lithium-Hydroxyapatite Composites. **Advances in Materials Science and Engineering**, v.2012, p.10, 2012.

SHARMA, S.; SRIVASTAVA, D.; GROVER, S.; SHARMA, V. Biomaterials in Tooth Tissue Engineering: A Review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR**, v.8, n.1, p.309-315, 2014.

SHIRKHAZADEH, M. Direct formation of nanophase hydroxyapatite on cathodically polarized electrodes. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.9, n.2, p.67-72, 1998.

SILVA, T. S. N.; MACHADO, D. C.; VIEZZER, C.; SILVA JÚNIOR, A. N.; OLIVEIRA, M. G. D. Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation: an experimental study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.24, p.200-205, 2009.

SINGH, R.; DAHOTRE, N. B. Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v.18, n.5, p.725-751, 2007.

SITTIG, C.; TEXTOR, M.; SPENCER, N. D.; WIELAND, M.; VALLOTTON, P. H. Surface characterization. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.10, n.1, p.35-46, 1999.

SJÖSTRÖM, T.; BRYDONE, A. S.; MEEK, D. R. M.; DALBY, M. J.; SU, B.; MCNAMARA, L. E. Titanium nanofeaturing for enhanced bioactivity of implanted orthopedic and dental devices. **Nanomedicine**, v.8, n.1, p.89-104, 2013.

STADLINGER, B.; POURMAND, P.; LOCHER, M. C.; SCHULZ, M. C. Systematic review of animal models for the study of implant integration, assessing the influence of material, surface and design. **Journal of Clinical Periodontology**, v.39 Suppl 12, p.28-36, 2012.

STEINEMANN, S. Titanium--the material of choice?. **Periodontology 2000**, v.17, p.7-21, 1998.

SUBRAHMANYAM, A.; RAJAKUMAR, A.; RAKIBUDDIN, M.; PAUL RAMESH, T.; RAVEENDRA KIRAN, M.; SHANKARI, D.; CHANDRASEKHAR, K. Efficacy of titanium doped-indium tin oxide (Ti/TiO₂-ITO) films in rapid oxygen generation under photocatalysis and their suitability for bio-medical application. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.16, n.45, p.24790-24799, 2014.

SUBRAMANIAM, M.; JALAL, S. M.; RICKARD, D. J.; HARRIS, S. A.; BOLANDER, M. E.; SPELSBERG, T. C. Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER alpha cells: bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.87, n.1, p.9-15, 2002.

SUL, Y. T.; JOHANSSON, C.; WENNERBERG, A.; CHO, L. R.; CHANG, B. S.; ALBREKTSSON, T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.20, n.3, p.349-359, 2005.

SUL, Y.-T.; JOHANSSON, C.; PETRONIS, S.; KROZER, A.; JEONG, Y.; WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. **Biomaterials**, v.23, n.2, p.491-501, 2002.

SYKARAS, N.; IACOPINO, A. M.; MARKER, V. A.; TRIPLETT, R. G.; WOODY, R. D. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.15, n.5, p.675-690, 2000.

TAO, Z.-S.; ZHOU, W.-S.; HE, X.-W.; LIU, W.; BAI, B.-L.; ZHOU, Q.; HUANG, Z.-L.; TU, K.-K.; LI, H.; SUN, T.; LV, Y.-X.; CUI, W.; YANG, L. A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats. **Materials Science and Engineering. C Materials for Biological Applications**, v.62, p.226-232, 2016.

TAXT-LAMOLLE, S. F.; RUBERT, M.; HAUGEN, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; MONJO, M. Controlled electro-implementation of fluoride in titanium implant surfaces enhances cortical bone formation and mineralization. **Acta Biomaterialia**, v.6, n.3, p.1025-1032, 2010.

THOMA, D. S.; SCHNEIDER, D.; MIR-MARI, J.; HAMMERLE, C. H.; GEMPERLI, A. C.; MOLENBERG, A.; DARD, M.; JUNG, R. E. Biodegradation and bone formation of various polyethylene glycol hydrogels in acute and chronic sites in mini-pigs. **Clinical Oral Implants Research**, v.25, n.4, p.511-521, 2014.

THORFVE, A.; BERGSTRAND, A.; EKSTROM, K.; LINDAHL, A.; THOMSEN, P.; LARSSON, A.; TENGVALL, P. Gene expression profiling of peri-implant healing of PLGA-Li+ implants suggests an activated Wnt signaling pathway in vivo. **PLoS One**, v.9, n.7, p.e102597, 2014.

THORFVE, A.; LINDAHL, C.; XIA, W.; IGAWA, K.; LINDAHL, A.; THOMSEN, P.; PALMQUIST, A.; TENGVALL, P. Hydroxyapatite coating affects the Wnt signaling pathway during peri-implant healing in vivo. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.3, p.1451-1462, 2014.

TOMAS, A.; LARS, S.; ANN, W. State of the art of oral implants. **Periodontology 2000**, 2008.

TSUI, Y. C.; DOYLE, C.; CLYNE, T. W. Plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium substrates Part 1: Mechanical properties and residual stress levels. **Biomaterials**, v.19, n.22, p.2015-2029, 1998.

VAN VELZEN, F. J.; OFEC, R.; SCHULTEN, E. A.; TEN BRUGGENKATE, C. M. 10-year survival rate and the incidence of peri-implant disease of 374 titanium dental implants with a SLA surface: a prospective cohort study in 177 fully and partially edentulous patients. **Clinical Oral Implants Research**, 2014.

VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; MOSEKILDE, L. Reduced Relative Risk of Fractures Among Users of Lithium. **Calcified Tissue International**, v.7, n.1, p.1-8, 2005.

VINCENT, L.; FRANK, L. T.; LARRY, D. G.; CAROLYN, R. C.; LARRY, J. S. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. **Journal of theoretical biology**, v.229, n. 3, p. 293-309, 2004.

WAHLGREN, M.; ARNEBRANT, T. Protein adsorption to solid surfaces. **Trends in Biotechnology**, v.9, n.1, p.201-208, 1991.

WALTER, M. S.; FRANK, M. J.; SATUE, M.; MONJO, M.; RONOLD, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; HAUGEN, H. J. Bioactive implant surface with electrochemically bound doxycycline promotes bone formation markers in vitro and in vivo. **Dental Materials**, v.30, n.2, p.200-214, 2014.

WANG, D.; BIERWAGEN, G. P. Sol-gel coatings on metals for corrosion protection. **Progress in Organic Coatings**, v.64, n.4, p.327-338, 2009.

WANG, J.; DE GROOT, K.; VAN BLITTERSWIJK, C.; DE BOER, J. Electrolytic deposition of lithium into calcium phosphate coatings **Dental Materials**, v.25, n.3, p.353-359, 2009.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; ANDERSSON, B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.11, n.1, 1996.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; ANDERSSON, B. Bone tissue response to commercially pure titanium implants blasted with fine and coarse particles of aluminum oxide International. **Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.11, n.1, 1996.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; LAUSMAA, J. Torque and histomorphometric evaluation of cp titanium screws blasted with 25-and 75- μ m-sized particles of Al₂O₃. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.30, n.2, p.251-260, 1996.

WILLIAMS, D. F.; ASKILL, I. N.; SMITH, R. Protein adsorption and desorption phenomena on clean metal surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.19, n.3, p.313-320, 1985.

WINFIELD, J. B.; MIMURA, T. Pathogenetic significance of anti-lymphocyte autoantibodies in systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology and Immunopathology**, 1992.

X, L. I. U.; P, C. H. U.; C, D. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v.47, 2004.

XIHUA, S.; JORGE, A. C.-A.; YANG, C.; ZHENG, Z.; MICHAEL, A. B.; JOHN, D. B. Properties of Human Serum Albumin Entrapped in Sol-Gel-Derived Silica Bearing Covalently Tethered Sugars. **Chemistry of Materials**, 2005.

XING, R.; SALOU, L.; TAXT-LAMOLLE, S.; RESELAND, J. E.; LYGSTADAAS, S. P.; HAUGEN, H. J. Surface hydride on titanium by cathodic polarization promotes human gingival fibroblast growth. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.102, n.5, p.1389-1398, 2014.

YAIR, S.; HADI, A.; ERAN, R.; YORAM, Z.; ILAN, K.; DAN, G.; ZULMA, G. Maxillofacial-derived stem cells regenerate critical mandibular bone defect. **Tissue engineering. Part A**, 2008.

YAO, C.; SLAMOVICH, E. B.; WEBSTER, T. J. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v.85, n.1, p.157-166, 2008.

YEO, I. S. Reality of dental implant surface modification: a short literature review. **Open Biomedical Engineering Journal**, v.8, p.114-119, 2014.

YOKOYAMA, K. I.; ICHIKAWA, T.; MURAKAMI, H.; MIYAMOTO, Y.; ASAOKA, K. Fracture mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implant **Biomaterials**, v.23, n.12, p.2459-2465, 2002.

YORUC; HAZAR, A. B.; #220; LAY; #160; O.; SENER; #160; C., B. **Examination of the properties of Ti-6Al-4V based plates after oral and maxillofacial application.** Bucuresti:Series INOE 2000, 2007. 7p.

YOSHIMITSU, O.; EMIKO, G. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. **Biomaterials**, 2005.

YOUNG-TAEG, S.; CARINA, B. J.; SARUNAS, P.; ANATOL, K.; YONGSOO, J.; ANN, W.; TOMAS, A. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. **Biomaterials**, 2002.

YOUNG-TAEG, S.; JÖNSSON, J.; GOUI-SEONG, Y.; JOHANSSON, C. Resonance frequency measurements in vivo and related surface properties of magnesium-incorporated, micropatterned and magnesium-incorporated TiUnite®, Osseotite®, SLA® and TiOblast® implants. **Clinical Oral Implants Research**, v.20, n.10, p.1146-1155, 2009.

ZHANG, Q.; LENG, Y.; LU, X.; XIN, R.; YANG, X.; CHEN, J. Bioactive films on metallic surfaces for osteoconduction. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.88A, n.2, p.481-490, 2009.