

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

Keicyanne Fernanda Lessa Dos Anjos

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E DA PROPRIEDADE BACTERICIDA
DE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO IMPREGNADOS COM LECTINA E
NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

RECIFE

2015

KEICYANNE FERNANDA LESSA DOS ANJOS

Avaliação da biocompatibilidade e da propriedade bactericida de nanotubos de dióxido de titânio impregnados com lectina e nanopartículas de prata para aplicações biomédicas

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Coorientadora: Dra. Janaina Viana de Melo

RECIFE

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- A597a Anjos, Keicyanne Fernanda Lessa dos.
Avaliação da biocompatibilidade e da propriedade bactericida de nanotubos de dióxido de titânio impregnados com lectina e nanopartículas de prata para aplicações biomédicas / Keicyanne Fernanda Lessa dos Anjos. - Recife: s.n, 2015.
94 p. : il., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.
Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo; coorientadora: Janaina Viana de Melo.
1. Titânio. 2. Nanotubos. 3. Teste de Materiais. 4. Lectinas. I. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de. II. Melo, Janaina Viana de. III. Título.

KEICYANNE FERNANDA LESSA DOS ANJOS

Avaliação da biocompatibilidade e da propriedade bactericida de nanotubos de dióxido de titânio impregnados com lectina e nanopartículas de prata para aplicações biomédicas

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 29/10/2015

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ
Departamento de Microbiologia

Dr^a Janaina Viana de Melo
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste/MCTI
Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise

Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia
Centro de Ciências Biológicas/ UFPE
Departamento de Bioquímica

Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ
Departamento de Imunologia

À minha avó (e, sobretudo mãe), Maria Tereza, que viu este sonho começar daqui e foi para o lado do Pai cheia de orgulho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por reservar e permitir as melhores oportunidades para a minha vida. Por todo o amor, cuidado, sabedoria e força. Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas;

À minha família, por todo o amor, suporte, incentivo e paciência.

Ao meu noivo, Felipe, por todo companheirismo e amor demonstrados durante absolutamente todos os segundos. Sem você teria sido muito mais difícil!

Às minhas orientadoras, Dra. Regina Bressan e Dra. Janaina Melo, por todos os ensinamentos, paciência, amizade e por estarem sempre acreditando em mim. Vocês foram incríveis. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) que me receberam de braços abertos e tornaram a rotina mais leve. Em especial à Alessandra e Fábria pelo apoio essencial nos experimentos.

À Dra. Giovanna Machado e seu grupo do CETENE pela disponibilidade e colaboração na área de materiais que foram fundamentais para a execução deste trabalho.

À Dra. Thaysa Stamford pela cooperação nos testes microbiológicos.

Às minhas amigas Joicy e Dayane por me escutarem em todos os momentos.

Ao Laboratório de Biologia Celular. Em especial à Mary, Andrezza e Cynarha pela amizade e por toda a prestatividade.

Ao CETENE e ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por terem cedido suas estruturas para a realização deste trabalho.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”
(José de Alencar)

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem o conhecimento e o entendimento.”
(Provérbios 2:6)

ANJOS, Keicyanne Fernanda Lessa dos. **Avaliação da biocompatibilidade e da propriedade bactericida de nanotubos de dióxido de titânio impregnados com lectina e nanopartículas de prata para aplicações biomédicas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

O titânio e suas ligas são os materiais mais comumente utilizados na substituição de tecidos duros por possuírem resistência mecânica, biocompatibilidade, resistência à corrosão e fácil manipulação. Embora o titânio possua várias vantagens sobre outros biomateriais, seu uso em longo prazo pode ocasionar problemas de rejeição. A modificação da superfície do titânio a fim de criar microrrugosidades é uma estratégia efetiva para melhorar a adesão e proliferação celular sobre implantes. Quando um implante danifica ou invade as barreiras epitelial e das mucosas, pode servir como reservatório para microrganismos e desta forma predispor à infecção. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi modificar a superfície do titânio, utilizando nanopartículas de prata (Ag) e lectina, a fim de melhorar a sua biocompatibilidade e conferir propriedades antimicrobianas a este material. O racional por trás destas mudanças é que a criação de uma topografia em nanoescala pode contribuir para mimetizar o ambiente celular melhorando a osseointegração e diminuindo o risco de infecção. Em nosso estudo, nanotubos de dióxido de titânio (NTs-TiO₂) com estrutura bem distribuída e organizada, com diâmetro em torno de 70–80nm, foram sintetizados por anodização eletroquímica e decorados com nanopartículas de Ag usando a técnica de *layer-by-layer* (LbL), enquanto a lectina do peixe *Oreochromis niloticus* (OniL) foi incorporada aos NTs-TiO₂ por *spin coating*. Estas amostras foram caracterizadas e avaliadas quanto a sua citotoxicidade, adesão celular, potencial osteogênico e atividade bactericida. Nossos resultados mostraram que tanto as nanopartículas de Ag, como a OniL foram incorporadas com sucesso à superfície dos NTs-TiO₂. Entretanto nossas preparações de LbL não foram capazes de melhorar a biocompatibilidade ou inibir o crescimento de bactérias nos NTs-TiO₂. Por outro lado, a funcionalização dos NTs-TiO₂ com a OniL induziu eficientemente a adesão e proliferação dos osteoblastos. Nossos resultados apontam para o uso da lectina OniL para melhorar a qualidade dos implantes de NT-TiO₂ existentes.

Palavras-chave: Titânio – Nanotubos – Teste de materiais – Lectina – Prata

ANJOS, Keicyanne Fernanda Lessa dos. **Biocompatibility evaluation and bactericidal property of impregnated titanium dioxide nanotubes with lectin and silver nanoparticles for biomedical applications.** . 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

Titanium and its alloys are the most commonly used materials for hard tissues replacement due to their mechanical strength, biocompatibility, corrosion resistance and easy handling. Although titanium has many advantages over other biomaterials, its long-term use may cause implant rejection problems. The modification of titanium surface to create micro-roughness is an effective strategy to improve adhesion and cell proliferation on the implant. When an implant damages or invades the epithelial or mucosa barriers, it may serve as a reservoir for microorganisms thereby predisposing to infection. In this regard, the aim of this work was to modify the surface of titanium, using silver (Ag) nanoparticles and lectin, in order to improve its biocompatibility and confer antimicrobial properties to this material. The rationale behind these changes is that the creation of a nanoscale topography may contribute to simulate the cellular environment improving osseointegration and decreasing the risk of infection. In this study, self-organized TiO₂ nanotubes (TiO₂-NTs), with a diameter of about 70-80 nm, were synthesized by electrochemical anodization and decorated with Ag nanoparticles using layer-by-layer (LbL) technique, whereas lectin from the fish *Oreochromis niloticus* (OniL) was incorporated to TiO₂-NTs by spin coating. These samples were characterized and evaluated for cytotoxicity, cell adhesion, osteogenic potential and bactericidal activities. Our results showed that both Ag nanoparticles, as well as OniL, were successfully incorporated to the surface of TiO₂-NTs. However, our LbL preparations are not able to improve the biocompatibility and inhibit bacterial growth on TiO₂-NTs. In the other hand, the functionalization of TiO₂-NTs with OniL efficiently induced the adhesion and proliferation of osteoblasts. Our results point out the use of lectin OniL to improve the quality of existing TiO₂ implants.

Key-words: Titanium - Nanotubes – Materials test - Lectin - Silver

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Biomateriais utilizados na atualidade.	18
Figura 2 –	Prótese mais antiga conhecida: Dedo artificial encontrado em uma múmia egípcia.	19
Figura 3 –	Dispositivos metálicos de aplicação médica	25
Quadro 1 –	Aplicações clínicas dos biomateriais	26
Figura 4 –	Diagrama representativo da biologia da osseointegração	30
Figura 5 –	Representação esquemática da formação de biofilme	32
Figura 6 –	Formas cristalográficas do titânio	34
Figura 7 –	Representação esquemática do processo de anodização em uma célula de dois eletrodos	37
Figura 8 –	Comparação entre nanotubos de TiO ₂ e a geometria óssea	38
Figura 9 –	Diagrama dos mecanismos de ação dos íons prata em bactérias	39
Figura 10 –	Representação esquemática do método de <i>Layer by Layer</i>	40
Figura 11 –	Nanotubos de TiO ₂ produzidos pelo processo de anodização	54
Figura 12 –	Espectro de EDS para superfície de Ti após anodização	55
Figura 13 –	Nanotubos de TiO ₂ revestidos com diferentes quantidades de camada de polímeros	57

Figura 14 –	Nanotubos de TiO ₂ impregnados com nanopartículas de prata	58
Figura 15 –	Espectros de EDS para nanotubos de TiO ₂ impregnados com nanopartículas de prata	59
Figura 16 –	Difratograma para nanotubos de TiO ₂ impregnados com nanopartículas de prata	60
Figura 17 –	Nanotubos de TiO ₂ impregnados com OniL	62
Figura 18 –	Voltamograma do eletrodo com Nanotubos de TiO ₂	63
Figura 19 –	Gráfico de Nyquist do eletrodo com as diferentes amostras em solução de 10mM de Ferri/Ferro x Ag/AgCl	64
Figura 20 –	Modelo do circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos na EIE	64
Figura 21 –	Espectroscopia no infravermelho	66
Figura 22 –	Espectroscopia no infravermelho com cristal de ATR da amostra NT-Onil antes e após lavagem.	66
Figura 23 –	Avaliação morfológica de osteoblastos cultivados sobre diferentes amostras – Grupo Ag	68
Figura 24 –	Avaliação da adesão de osteoblastos cultivados sobre diferentes amostras – Grupo OniL	70
Figura 25 –	Avaliação da adesão de osteoblastos cultivados sobre diferentes amostras – Grupo Ag	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	–	Quantificação da adesão de osteoblastos sobre as diferentes amostras	72
Gráfico 2	–	Viabilidade celular de osteoblastos sobre as diferentes amostras	74
Gráfico 3	–	Atividade da fosfatase alcalina em células cultivadas sobre as diferentes amostras	75
Gráfico 4	–	Quantificação do cálcio em células cultivadas sobre as diferentes amostras	75
Gráfico 5	–	Citotoxicidade das soluções incorporadas às amostras sobre osteoblastos	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resultados para determinação de Ag por ICP-MS em amostras de NT de TiO ₂	61
Tabela 2 –	Valores ajustados dos parâmetros obtidos do circuito equivalente para NT-TiO ₂ , NT-Neg e NT-OniL em 10mM de solução de ferri/ferro.	65
Tabela 3 –	Crescimento de diferentes cepas microbiológicas sobre a superfície das amostras.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	– Adenosina trifosfato
bcc	– <i>body centered cubic</i>
BHI	– Brain Heart Infusion
CRD	– <i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
DAPI	– <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DRX	– Difração de Raios X
EDS	– Espectroscopia de energia dispersiva
EIE	– Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
hcp	– <i>hexagonal closed packed</i>
ICP-MS	– Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
LAQIA	– Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais
LbL	– <i>Layer by Layer</i>
LNLS	– Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MEC	– Matriz extracelular
MEM	– <i>Minimum Essential Medium</i>
MEV	– Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	– <i>3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
OniL	– <i>Oreochromis niloticus Lectin</i>
PAA	– Ácido poliacrílico

PAH	– Hidrocloro de polialilamina
PBS	– Tampão fosfato salino
PCL	– Policaprolactona
PGA	– Ácido poliglicólico
PHB	– Ácido polihidroxibutirato
PLA	– Ácido polilático
PLLA	– Poli-L-ácido lático
SFB	– Soro Fetal Bovino
TBS	– Solução salina tamponada com Tris
TCP	– Fosfato de cálcio
Ti cp	– Titânio comercialmente puro
UFC	– Unidade Formadora de Colônia
UV	– Ultravioleta
VC	– Voltametria Cíclica
Y-TZP	– Policristais tetragonais de zircônia

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO-CONCEITUAL	18
1.1	Biomateriais: definição e histórico	18
1.2	Classificação dos biomateriais	20
1.2.1	<i>Biomateriais naturais</i>	20
1.2.2	<i>Biomateriais sintéticos</i>	21
1.2.2.1	Cerâmicas	21
1.2.2.2	Polímeros sintéticos	22
1.2.2.3	Compósitos	23
1.2.2.4	Metálicos	24
1.3	Interação biomaterial – receptor	26
1.3.1	<i>Biocompatibilidade</i>	26
1.3.2	<i>Osseointegração</i>	27
1.3.3	<i>Infecções associadas a implantes</i>	30
1.4	Titânio como biomaterial	33
1.5	Modificação de superfícies em biomateriais	35
1.5.1	<i>Anodização e nanotubos de TiO₂</i>	36
1.5.2	<i>Incorporação de nanopartículas de prata</i>	38
1.5.3	<i>Lectinas</i>	40
2	JUSTIFICATIVA	43
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	METODOLOGIA	46
4.1	Síntese das amostras	46
4.1.1	<i>Negativação da superfície nanotubular</i>	46
4.1.2	<i>Incorporação de nanopartículas por Layer by Layer</i>	46

4.1.3	<i>Funcionalização com a lectina OniL por Spin Coating</i>	47
4.2	Caracterização das amostras	47
4.2.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV)</i>	47
4.2.2	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	47
4.2.3	<i>Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)</i>	48
4.2.4	<i>Medidas eletroquímicas</i>	48
4.2.5	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	49
4.3	Avaliação da biocompatibilidade	49
4.3.1	<i>Cultivo de osteoblastos</i>	49
4.3.2	<i>Avaliação morfológica</i>	50
4.3.3	<i>Teste de adesão</i>	50
4.3.4	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	51
4.3.5	<i>Atividade da fosfatase alcalina</i>	51
4.3.6	<i>Quantificação de cálcio</i>	52
4.3.7	<i>Avaliação da citotoxicidade das soluções incorporadas</i>	52
4.4	Avaliação da atividade antimicrobiana	52
4.5	Análise estatística	53
5	RESULTADOS	54
5.1	Síntese e caracterização das amostras	54
5.1.1	<i>Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag</i>	55
5.1.2	<i>Nanotubos de TiO₂ impregnados com OniL</i>	61
5.2	Avaliação da Biocompatibilidade	66
5.2.1	<i>Avaliação morfológica</i>	67
5.2.2	<i>Avaliação da adesão celular</i>	69
5.2.3	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	73
5.2.4	<i>Avaliação do potencial osteogênico</i>	74
5.2.5	<i>Avaliação da citotoxicidade das soluções incorporadas</i>	76

5.3	Atividade antimicrobiana	77
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	85

1 REFERENCIAL TEÓRICO-CONCEITUAL

1.1 Biomateriais: definição e histórico

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, de origem não medicamentosa, as quais são toleradas de forma transitória ou permanente pelo organismo. Os biomateriais são muito utilizados na confecção de implantes, próteses, aparelhos ou sistemas, que substituem de forma parcial ou total, quaisquer tecidos ou órgãos do corpo. Estes materiais interagem com sistemas biológicos e tecidos vivos, com o objetivo de reparar perdas teciduais e restaurar funções comprometidas por processos degenerativos ou traumatismos (SILVA, 2011; VON RECUM; LABERGE, 1995).

Atualmente as aplicações dos biomateriais são vastas: tecidos moles, ortopedia, odontologia, regeneração óssea, substitutos de válvulas cardíacas e lentes intraoculares, liberação controlada de fármacos (*drug delivery*), produtos para diagnóstico, regulação da fertilidade em bovinos, arranjos gênicos para diagnóstico, *biochips*, entre outros. Os biomateriais também são utilizados como estimuladores cardíacos e na reconstrução do trato urinário. Estas aplicações só são possíveis graças ao perfil multidisciplinar da área que agrupa profissionais como químicos, físicos, engenheiros e especialistas em ciências biomédicas (GEETHA; SINGH; GOGIA, 2009).

Figura 1 – Biomateriais utilizados na atualidade



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Exemplos dos diversos tipos de biomateriais: implantes (A) dentário, (B) ortopédico e (C) lente intraocular.

Apesar do termo “biomaterial” ter surgido há apenas 50 anos, a introdução de materiais, de origem natural ou não, no corpo humano remonta da pré-história. Há evidências de que suturas foram usadas há mais de 32.000 anos atrás. O ouro foi usado pelos romanos, chineses e astecas em tratamentos dentários há mais de 2.000 anos. Lentes de vidro e dentes de madeira foram comumente utilizados durante grande parte da história (RATNER et al.,

2004). A mais antiga prótese conhecida do mundo datada em 2.600 anos foi encontrada no Egito, na cidade de Tebas. Trata-se de um dedo artificial feito à base de linho prensado que apresentava coloração semelhante à da pele e textura de couro. Na sua extremidade digital, observa-se um vidro em forma de unha (**Figura 2**). Os furos em volta do artefato sugerem que eram presos ao órgão mutilado com tiras. Um antebraço artificial pode também ser visto em uma múmia exposta no museu de Arlington na Inglaterra e esculturas sintéticas de pés, no museu de Manchester (DIAS, 2006).

Figura 2 – Prótese mais antiga conhecida: dedo artificial encontrado em uma múmia egípcia.



Fonte: Museu Egípcio do Cairo (DEDÃO..., 2012).

Uma série de fatos históricos mais recentes contribuiu para desencadear a evolução da ciência dos biomateriais. A revolução industrial trouxe um grande avanço no conhecimento da anatomia e fisiologia através do aprimoramento de técnicas e materiais. Além disso, Horace Wells introduziu a anestesia em cirurgias no ano de 1844. Após a Segunda Guerra Mundial, o desenvolvimento dos biomateriais assumiu grande relevância, dado a necessidade de oferecer tratamentos paliativos ao grande número de condições clínicas graves relacionadas aos acidentes e desastres ocorridos. Assim, muitos materiais passaram a ser utilizados em técnicas de transferência de tecidos ou ainda como materiais para próteses e dispositivos médicos (RATNER et al., 2004).

A ciência dos biomateriais, como é reconhecida atualmente, ganhou força no Simpósio de Biomateriais da Universidade de Clemson no final da década de 1960. O sucesso científico deste Simpósio e as ideias inovadoras destas reuniões levaram à formação da *Society of Biomaterials* em 1975 e refletiu no fortalecimento deste seguimento (RATNER et al., 2004).

1.2 Classificação dos biomateriais

Quanto à composição química, os biomateriais podem ser classificados em naturais e sintéticos. Estes últimos podem ainda ser classificados como cerâmicos, poliméricos, compósitos e metálicos.

1.2.1 Biomateriais naturais

Nos últimos anos, os biomateriais naturais vêm despertando o interesse de vários grupos de pesquisa, devido sua alta performance na remodelagem de tecidos e biocompatibilidade. Biomateriais de origem natural podem ser classificados em vários grupos: (a) os de origem proteica, tais como o colágeno, elastina (DESAI; LEE, 2015), a soja (TANSAZ; BOCCACCINI, 2015) e a seda (THURBER; OMENETTO; KAPLAN, 2015); (b) polissacarídeos como a celulose e a quitosana (CHEUNG et al., 2015); e (c) biomateriais derivados de processos de descelurização (TANSAZ; BOCCACCINI, 2015).

Biomateriais derivados de proteínas e polissacarídeos são obtidos normalmente de organismos vivos tais como algas e animais, após tratamento com solventes ou enzimas. As proteínas tem atraído bastante a atenção como biomateriais para aplicações biológicas devido a sua abundância nos organismos, sua biocompatibilidade e suas propriedades adesivas, sendo preferíveis a polímeros sintéticos ou outros biopolímeros. Esta preferência se dá porque proteínas formam a maior parte do corpo, como arcabouços, sendo mais fácil de manter as funções da matriz extracelular com proteínas, do que com outros polímeros. Além do mais, por possuírem grupos carboxílicos e amino, as proteínas carregam diferentes cargas, podendo ser facilmente moduladas para responder a diferentes pH no organismo. O colágeno e a seda são os mais utilizados para aplicações médicas, no entanto, apresentam pouca molhabilidade e são potencialmente imunogênicos. De forma similar, a degradação lenta e a dificuldade de dissolver e preparar biomateriais a partir da seda restringe o seu uso. As proteínas oriundas de plantas como milho, trigo e soja são rapidamente disponíveis, biodegradáveis e possuem menos efeitos adversos e menor potencial imunogênico quando comparadas com proteínas animais, tais como o colágeno (REDDY; YANG, 2011; TANSAZ; BOCCACCINI, 2015).

Os materiais desceluralizados são criados pela eliminação de todos os elementos celulares dos tecidos/órgãos. Este processo tem sido à base da medicina regenerativa e da engenharia de tecidos. Avanços nas técnicas de descelurização de órgãos inteiros tem

permitido a fabricação de arcabouços para engenharia de novos órgãos. Estes arcabouços consistem na matriz extracelular de origem natural, fornecendo os sinais biológicos e mantendo a microarquitetura do tecido, incluindo seu sistema vascular, que pode se integrar ao sistema circulatório próprio do receptor. Apesar desta técnica ser bastante promissora, o transplante de órgãos obtidos ainda impõe vários desafios (ARENAS-HERRERA et al., 2013, WANG; CHRISTMAN, 2015).

Devido às suas vantagens, biomateriais naturais são frequentemente aplicados para substituir ou restabelecer a estrutura e função de tecidos/órgãos danificados. Apresentam a habilidade de suportar a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. Quando implantado em uma área danificada, aumentam naturalmente a adesão e migração de células do ambiente próximo, induzem a formação de matriz extracelular e promovem a reparação do tecido. Alguns biomateriais são usados como sistema de entrega controlada de fármacos e como suturas (HA et al., 2013).

1.2.2 Biomateriais sintéticos

1.2.2.1 Cerâmicas

As cerâmicas têm sido um dos componentes de implantes ortopédicos desde a década de 1970 e, a partir de então, a tecnologia por trás da manufatura destes biomateriais tem resultado em produtos com características indispensáveis para sua utilização, tais como grande densidade, baixa porosidade e aumento da força de fratura (KURTZ et al., 2014). As cerâmicas possuem diversas vantagens como biomateriais sintéticos na substituição ao tecido ósseo. Entre essas características, destacam-se: (a) semelhança estrutural ao componente inorgânico do osso; (b) biocompatibilidade; (c) osteocondução; (d) longo tempo de degradação *in vivo*, permitindo a remodelação óssea no sítio do implante (ABUKAWA et al., 2006; BOHNER et al., 2010). As principais cerâmicas disponíveis comercialmente e utilizadas para reparação e substituição do tecido ósseo são a hidroxiapatita (ZHOU; LEE, 2011) e o fosfato de cálcio (TCP) (BOHNER et al., 2013). A alumina foi introduzida como biomaterial devido ao seu baixo grau de fricção, molhabilidade, resistência e biocompatibilidade. No entanto, seu uso clínico em ortopedia levou a altos índices de fratura. Na década de 1980, a zircônia foi introduzida na ortopedia por ser mais resistente ao estresse mecânico quando comparada com alumina (KURTZ et al., 2014). Ainda assim, a utilização

desse material sobre a forma de policristais tetragonais de zircônia (Y-TZP) se mostrou altamente dependente do ambiente e da condição de uso. Por esta razão, seu emprego na ortopedia foi praticamente abandonado. Atualmente Y-TZP é principalmente utilizado na dentística (FABBRI et al., 2014). Apesar de serem extensivamente utilizadas, as cerâmicas ainda apresentam limitações relacionadas à sua baixa rigidez estrutural e sua natureza porosa, de forma que não podem ser utilizadas em regiões de grande esforço mecânico, sob o risco de provocar fraturas (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006).

1.2.2.2 Polímeros sintéticos

Os biomateriais de origem polimérica são compostos orgânicos que possuem estruturas moleculares muito grandes baseadas em carbono, hidrogênio e outros elementos não metálicos. Os polímeros, principalmente os biodegradáveis, têm sido utilizados pela engenharia tecidual para o desenvolvimento de moldes ou arcabouços (*scaffolds*) tridimensionais para confecção de cartilagens, ligamentos, meniscos e discos intervertebrais. (NAVARRO et al., 2008). Para o sucesso dos moldes tridimensionais é preciso ter em mente a complexidade organizacional dos tecidos. As células respondem a vários estímulos apresentados pela matriz extracelular (MEC), a principal estrutura regulatória e componente estrutural de tecidos, composta por proteínas fibrosas, proteoglicanas e glicoproteínas. Desta forma, a construção de arcabouços, tanto de origem natural ou sintético, que mimetizem a MEC tem sido objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa. Atualmente, materiais têm sido designados com objetivo de regular a regeneração dos tecidos através de diferentes mecanismos, tais como o controle de interações de adesão celular, liberação de fatores de crescimento e regulação de maneira controlada da degradação de seus componentes em resposta a estímulos ambientais (CHAN; MOONEY, 2008).

Quando se pensa em reparo tecidual através da construção de moldes que se aproximem das características naturais dos tecidos, componentes purificados da MEC ou MEC descelularizada derivadas de animais, parecem ser a escolha mais lógica. No entanto, o potencial imunogênico, a possibilidade de transmissão de doenças e a alta variabilidade dos componentes da MEC impõem limitações ao seu uso clínico (CHAN; MOONEY, 2008).

Uma variedade de polímeros sintéticos biodegradáveis, incluindo ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ácido polihidroxibutirato (PHB) e a policaprolactona (PCL) têm sido caracterizados e largamente utilizados na engenharia de tecidos. Dentre as vantagens

do uso destes polímeros, destacam-se: (a) fácil controle de síntese; (b) origem ilimitada; (c) não sofrem degradação mediada por células; (d) superfície hidrofóbica; e (e) biocompatibilidade. Apesar dessas vantagens, os polímeros possuem as seguintes limitações: (a) pouca resistência mecânica; (b) redução de tamanho ao longo do tempo; e (c) questionável interação com as células com possibilidade de reação tóxica local pela liberação de produtos ácidos devido a sua degradação natural (ABUKAWA, 2006; OH et al., 2006; PRECHEUR, 2007). Desta forma, a descoberta e a síntese de novos métodos de controle da degradação destes polímeros é uma importante área de estudo no campo da engenharia tecidual. Os polímeros estão indicados na ortopedia e também como dispositivos implantados para a liberação de fármacos (OH et al., 2006).

1.2.2.3 Compósitos

O tecido ósseo é um dos mais comumente transplantado, correspondendo a uma estimativa de 2,2 milhões de enxertos feitos anualmente (SAIZ et al., 2013). O enxerto ósseo tem sido realizado para corrigir defeitos que surgem devido a traumas severos, deformidades no desenvolvimento, diminuição da dor ou reconstrução de juntas danificadas. Para estes fins, o padrão ouro tem sido os enxertos autógenos, utilizando tecido do próprio paciente. No entanto, este procedimento possui limitações, como fonte restrita de tecido e cirurgia adicional para retirada da região a ser transplantada, com uma taxa de falha de 50% em ambientes de difícil cicatrização que pode aumentar a morbidade do paciente. Uma segunda alternativa, que contribui atualmente com 34% do total de enxertos ósseos realizados, é utilizar tecidos de outros pacientes (enxerto alógeno). Este tipo de procedimento também apresenta riscos como o de transmissão de doenças e infecção. Como resultado dessas limitações, o uso de implantes sintéticos para substituir o tecido ósseo danificado tem crescido exponencialmente (SAIZ et al., 2013).

A evolução de materiais, principalmente para reparos ósseos, pode ser categorizada em quatro diferentes gerações: A primeira foram os metais e suas ligas, os quais possuíam excelentes propriedades mecânicas, mas não eram reabsorvíveis ou bioativos, necessitando de substituição cirúrgica ao longo do tempo. A segunda geração inclui a criação de moldes de cerâmicas bioativas ou polímeros reabsorvíveis. Os polímeros, no entanto, não apresentaram bioatividade e propriedades mecânicas adequadas, enquanto que as cerâmicas como molde eram demasiadamente frágeis para suportar esforço mecânico. Para solucionar as

desvantagens das cerâmicas e polímeros, foi desenvolvida uma terceira geração de materiais sintéticos híbridos ou compósitos, que possuíam as vantagens das cerâmicas e polímeros, porém com melhores taxas de reabsorção após a implantação e uma melhor resistência mecânica (BASHA; SAMPATH KUMAR; DOBLE, 2015; WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006). O termo compósito refere-se à classe de materiais sintéticos compostos por diferentes constituintes e que possuem propriedades finais distintas daquelas apresentadas pelos seus componentes separadamente (REYES-GALLARDO et al., 2015). Um exemplo clássico é o compósito de matriz polimérica com fibra de vidro, que apresenta a resistência da fibra de vidro associado à flexibilidade do polímero. Uma quarta geração em crescente desenvolvimento inclui o uso de compósitos polímero-cerâmica com a introdução de células osteogênicas, fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas, utilizadas isoladamente ou em combinação (BASHA; SAMPATH KUMAR; DOBLE, 2015). Um estudo preliminar *in vitro* realizado por Oledzka et al. (2015) demonstrou que o compósito constituído por hidroxiapatita-íons de selênio e um polímero biodegradável, que continha como substância ativa o bifosfonato, se mostrou promissor para a entrega sustentável de moléculas bioativas nos sítios de defeito ósseo para terapia de tumores. A principal limitação no uso dos compósitos pode ser a incompatibilidade dos materiais que se deseja aliar.

1.2.2.4 Metálicos

Os primeiros biomateriais metálicos utilizados com sucesso para reparo ósseo foram o aço inoxidável e as ligas de cobalto e cromo, por volta de meados do século XX (CHARNLEY, 1960). A principal característica desses biomateriais é seu grande potencial de resistência à corrosão *in vivo*. Além disso, também apresentam boa resistência mecânica, alta resistência à fadiga, a tração e à fratura (OLIVEIRA et al., 2010). A partir dos primeiros biomateriais produzidos, novas constituições de aço inoxidável, assim como novas ligas metálicas, como as de titânio, foram produzidas a fim de melhorar suas propriedades anticorrosivas e de resistência mecânica (BRANEMARK; BREINE, 1969; LONG; RACK, 1998). Atualmente, os metais são usados como substitutos de tecidos duros, como por exemplo, em substituições totais de quadril e joelho, placas e parafusos para fixação de fraturas, dispositivos de fixação de coluna e implantes dentários (WONG; BRONZINHO, 2007). Outros exemplos são apresentados na Figura 3.

Figura 3 – Dispositivos metálicos de aplicação médica

Fonte: Biofabris (2015)

Legenda: (a) Cabeça femoral; (b) Articulação superior de joelho; (c) Placa de articulação mandibular.

Entretanto, os biomateriais metálicos em atrito direto ainda sofrem desgaste acentuado e sua interação com o tecido adjacente ocasiona a liberação de íons metálicos por dissolução, desgaste ou corrosão (MORAIS; GUIMARAES; ELIAS, 2007). Além do mais, estes biomateriais podem levar à perda do estímulo mecânico no osso, e reabsorção óssea local com eventual perda do implante (BAUER; SCHILS, 1999; GEETHA; SINGH; GOGIA, 2009; HUISKES; WEINANS; RIETBERGEN, 1992).

Segundo Barbucci (2002), um material metálico usado na construção de próteses ortopédicas, implantes dentários ou dispositivos de regeneração óssea deve possuir as seguintes características: limite de resistência maior que 800 MPa; resistência à corrosão geral e localizada; e biocompatibilidade. Acontece que estes parâmetros são tão restritivos que apenas uma pequena parcela das classes de materiais metálicos pode ser usada com sucesso. Dentre os biomateriais metálicos, os aços inoxidáveis do tipo 316 LVM, as ligas Co-Cr-Mo, Co-Ni-Cr-Mo, titânio puro e Ti-6Al-4V são os mais utilizados. Demonstrou-se que elementos como Níquel, Cromo e Cobalto são liberados e podem causar efeitos tóxicos. A liberação de cobalto das próteses, por exemplo, pode levar ao impedimento sensorio-neural, perda de visão, perda cognitiva, danos cardíacos, neuropatia e hipotireoidismo. Desta forma, pacientes com próteses contendo este metal devem ser acompanhados por um médico toxicologista (PIZON et al., 2013). Outro fator importante a ser considerado no caso de próteses e implantes metálicos é a alta expectativa de vida dos pacientes em contraponto com o tempo de vida destes biomateriais. Assim, espera-se que os implantes e próteses possam ser construídos com materiais que possam ter durabilidade, sem falhas ou necessidade de revisão cirúrgica (GEETHA; SINGH; GOGIA, 2009). Tendo em vista este cenário, o titânio e suas ligas tem se mostrado uma escolha ideal como biomaterial. No tocante a este biomaterial, objeto do presente estudo, discutiremos mais profundamente nos tópicos seguintes as razões pelas quais o uso deste metal vem sendo cada vez mais empregado. No entanto, faz-se necessário antes uma breve introdução aos requerimentos que um biomaterial deve satisfazer dentro do

contexto de sua interação com o seu indivíduo receptor. O quadro 1 apresenta um resumo da classificação, vantagens, desvantagens e aplicações clínicas dos biomateriais.

Quadro 1 – Aplicações clínicas dos biomateriais

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros Poliétileno PTFE Poliéster Poliuretano PMMA Silicona	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Suturas, artérias, veias; maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); cimento, tendão artificial; oftalmologia.
Metais e ligas Aço inoxidável Liga de titânio Liga de cobalto-cromo	Alta força de tensão, alta resistência a desgaste, energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); implantes dentários
Cerâmicas e vidros Alumina Zircônia Carbono Fosfatos de cálcio Porcelana Vidros bioativos	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta resistência à compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traqueias artificiais
Compósitos Fibra de carbono-resina termofixa Fibra de carbono-termoplástico Carbono-carbono Fosfato de cálcio-colágeno	Boa biocompatibilidade, inércia, resistência à corrosão, alta força de tensão	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelho (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade)

Fonte: Kawachi et al. (2000)

1.3 Interação biomaterial - receptor

1.3.1 Biocompatibilidade

Raramente os biomateriais são usados isoladamente, sendo sempre integrados a implantes ou outros aparatos. Desta forma, não podemos separar biomateriais de compatibilidade. A biocompatibilidade ocorre quando os tecidos entram em contato com um determinado material e não manifestam qualquer tipo de experiência tóxica, irritante, inflamatória, alérgica ou de fundo mutagênico ou carcinogênico (KAO et al., 2007). A ocorrência de qualquer reação adversa é chamada de toxicidade. Os biomateriais podem ser classificados em quatro classes de acordo com a resposta biológica que apresentam com os tecidos adjacentes (BATH, 2002; SANTOS, 2002):

- a) **Biotolerantes:** Implantes separados do osso adjacente por uma camada de tecido mole ao longo da interface. Não há contato na osteogênese. Praticamente todos os polímeros sintéticos e a grande maioria dos metais se enquadram nessa categoria;
- b) **Bioinertes:** Implantes em contato direto com o tecido ósseo, participando na osteogênese. Não ocorre nenhuma reação química detectável entre o tecido e o implante. Exemplos: a alumina, zircônia, titânio, tântalo e carbono;
- c) **Bioreabsorvíveis:** Materiais que após períodos de tempo em contato com os tecidos são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. São aplicados em casos onde a reintervenção para retirada do implante não seja recomendada. Os representantes desta classe são TCP e o poli-L-ácido láctico (PLLA);
- d) **Bioativos:** Estes materiais induzem uma resposta específica na interface implante-tecido. Por similaridade química de componentes orgânicos e minerais presentes no fluido do corpo humano ocorre a ligação do tecido ósseo ao implante, promovendo a osteocondução. As cerâmicas de fosfato de cálcio destacam-se entre os materiais bioativos, em especial, a hidroxiapatita.

Além da compatibilidade, para um material ser biologicamente adaptado com sucesso e com função de longa duração precisa ter também uma superfície bioativa para resistir a quaisquer mecanismos biológicos envolvidos no fenômeno da rejeição. Tão importante quanto, o material deverá ser produzido numa forma ótima para a aplicação clínica. Dentro desse contexto, o titânio, com sua ampla aplicação tanto em aparelhos médicos quanto em implantes dentários, conquistou e ocupa um lugar de destaque e de importância na confecção de implantes e, principalmente, na osseointegração (BESSAUER, 2011).

1.3.2 Osseointegração

O processo de osseointegração envolve vários eventos biológicos que determinam a estabilidade mecânica e o resultado do implante (GITTENS et al., 2014; JAYESH; DHINAKARSAMY, 2015). O termo osseointegração foi pioneiramente empregado por Branemark em 1952 para designar o fenômeno histopatológico que foi observado entre o titânio e o tecido ósseo em suas pesquisas científicas. Em 1969, ele publicava o seu primeiro trabalho sobre a osseointegração (BRANEMARK; BREINE, 1969). Neste estudo, o autor enfatizava a necessidade de compreender a biologia dos fenômenos de cicatrização e reparo

do organismo ao se introduzir um objeto metálico dentro do tecido ósseo, objetivando uma fixação rígida e duradoura (JAYESH; DHINAKARSAMY, 2015).

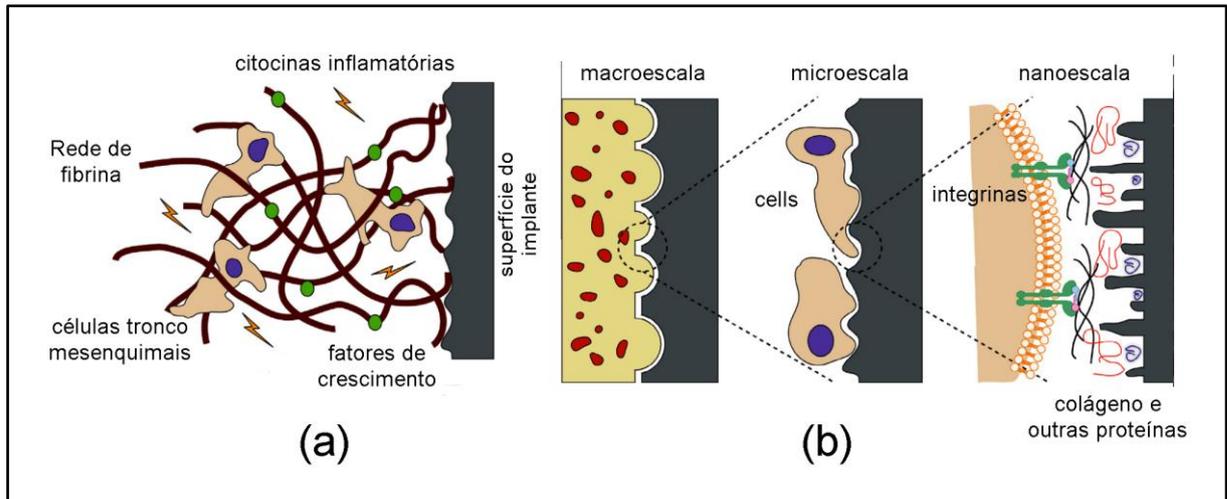
A osseointegração foi definida por Branemark como o processo de conexão direta estrutural e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante submetido a uma carga oclusal (BRANEMARK; BREINE, 1969). Mais tarde, este conceito foi ampliado por Albrektsson, quando definiu osseointegração como o contato direto entre o osso vivo ordenado e a superfície de um implante carregado, com comprovação histológica em microscopia óptica (VASCONCELOS et al., 2000). Quando a interface obtida com a fixação cirúrgica de um implante metálico possui as características do osso circundante, passa a receber a denominação de interface osseointegrada.

O uso de implantes metálicos e poliméricos para aplicações ortopédicas e dentísticas tem evoluído nos últimos 60 anos com maiores avanços provenientes da área de odontologia. Originalmente, os implantes eram pensados com um simples ponto de ancoragem mecânica com o osso. No entanto, o desconhecimento dos fenômenos de interação implante-tecido adjacente levavam a uma alta taxa de falha e perda destes dispositivos devido a formação de um tecido fibroso entre o osso e o implante, com intensa reabsorção óssea. (BRANEMARK, 2001; GITTENS et al., 2014). Este tipo de falha é comumente atribuído à toxicidade gerada pelo desgaste do material implantado, que eventualmente é fagocitado por macrófagos e outras células. No entanto, a resposta inflamatória asséptica ao implante também pode ocorrer. O ponto chave do processo de osseointegração está no contato direto entre a superfície do implante e o tecido ósseo. Assim, acredita-se atualmente que a presença da resposta fibrótica pode ser evitada pelo controle das propriedades da superfície do implante, tais como o aumento da microrugosidade para promover uma perfeita osseointegração (GITTENS et al., 2014). O processo de osseointegração envolve uma complexa cadeia de eventos desde a adsorção de proteínas e formação do coágulo na superfície do biomaterial, até o reconhecimento biológico pelas células mesenquimais e osteoblastos. Estes eventos levam à formação do osso na interface e desta forma criam uma íntima ligação com o implante. (GITTENS et al., 2014). Um dos primeiros eventos que ocorre quando um material é implantado é a adsorção de água, proteínas e lipídios do sangue para a superfície do implante. O perfil de proteínas vai depender das características da superfície do material implantado. Muitas destas proteínas como o fibrinogênio e moléculas do sistema complemento estão associadas a uma resposta inflamatória, enquanto outras como a fibronectina e vitronectina estão relacionadas à adesão celular. Ainda, a adesão de plaquetas e subsequente liberação de

seus componentes leva a formação de uma rede de fibrina, um arcabouço ainda rudimentar que facilita a migração de células para a superfície do implante. Nesta etapa, uma superfície mais rugosa do implante pode favorecer a interação com grandes quantidades de fibrina, promovendo uma melhor resposta cicatrizante (SAIZ et al., 2013).

As primeiras células a chegarem no sítio do implante são as células fagocíticas profissionais, neutrófilos e macrófagos, as quais são responsáveis pela limpeza do ferimento de possíveis patógenos e debris necróticos. Outras células importantes são as células tronco mesenquimais provenientes da medula óssea e do sangue. Ao serem expostas às citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, as células tronco mesenquimais se diferenciam em vários tipos celulares tais como osteoblastos, condrócitos e fibroblastos. O processo de diferenciação celular dependerá das características do ambiente extracelular e da superfície do implante, dando início à formação do osso. Uma vez o implante estável e a rede de fibrina firmemente estabelecida, dá-se a formação de osso em duas direções: na superfície do osso adjacente ao implante (osteogênese distante) e diretamente sobre a superfície deste (osteogênese de contato). A osteogênese de contato é requerida para o sucesso da osseointegração e deve ser promovida pela superfície do implante. O próximo passo para a osseointegração requer o remodelamento ósseo mediado principalmente pelos osteoclastos, os quais reabsorvem o osso recém formado para resolver as microfraturas e preparar a superfície do osso. Como resultado, surge um novo nível de complexidade em escala nanométrica. Esta nanotopografia mimetiza as condições necessárias aos osteoblastos para a formação de um novo tecido ósseo e assume papel de suma importância no sucesso do implante. O diagrama mostrado na figura 4 representa a biologia da osseointegração (GITTENS et al., 2014).

Figura 4 – Diagrama representativo da biologia da osseointegração.



Fonte: Adaptado de Gittens et al. (2014).

Legenda: (a) Diagrama mostrando as primeiras etapas do processo de osseointegração, com a formação da rede de fibrina sobre a superfície do implante. Células mesenquimais são atraídas para essa região e migram através da malha de fibrina até a superfície do implante, sendo expostas a fatores de crescimento e citocinas inflamatórias que podem influenciar no seu processo de diferenciação. (b) Interações entre o osso e a superfície do implante em diferentes escalas. Na macroescala, o implante deve fornecer uma base mecânica para a boa fixação do osso. Na microescala, as características micro e submicroscópicas apresentadas na superfície favorecem a ligação de osteoblastos e células mesenquimais. Ao nível de nanoescala, receptores de membrana destas células, tais como as integrinas, podem reconhecer proteínas adsorvidas na superfície do implante, as quais por sua vez são moduladas pela característica nanométrica da superfície.

1.3.3 Infecções associadas a implantes

Embora as taxas de sucesso dos implantes sejam dependentes da osseointegração, a manutenção dos mesmos requer a prevenção de infecções bacterianas após a implantação no organismo, a fim de evitar revisões cirúrgicas custosas.

Infecções associadas ao uso de biomateriais tem sido consideradas como uma desastrosa complicação, principalmente nas cirurgias ortopédicas (GALLO; HOLINKA; MOUCHA, 2014). Os microrganismos tendem a aderir fortemente sobre as superfícies, dando início a uma complexa comunidade microbiana aderente chamada de biofilme (GAO et al., 2014). Os biofilmes são clinicamente importantes, representando mais de 80% das infecções microbianas no corpo, incluindo infecções causadas por próteses e dispositivos de fixação interna. Estudos *in vitro* mostraram que *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* podem facilmente formar biofilmes sobre aço inoxidável e parafusos ortopédicos de titânio (VEERACHAMY et al., 2014). Logicamente, a formação de biofilme nas superfícies de biomateriais implantáveis e as complicações de infecções

subsequentes são uma razão frequente para o insucesso de muitos dispositivos biomédicos (GAO et al., 2014).

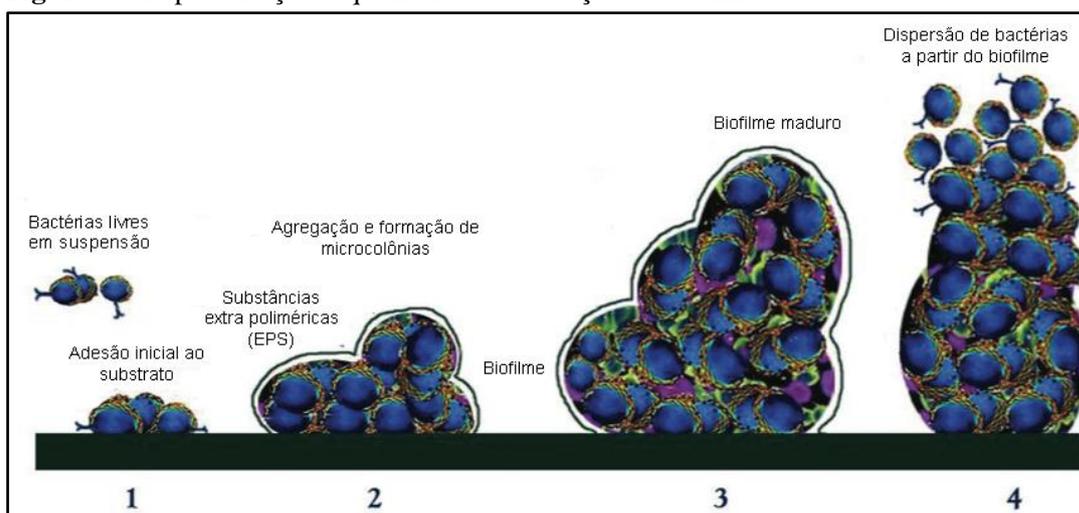
A fase primária de formação do biofilme envolve a rápida adesão e proliferação dos microrganismos na superfície dos dispositivos médicos. Após o contato inicial, os microrganismos iniciam a produção de fibras finas, que se tornam mais grossas com o tempo, levando a formação da matriz dos biofilmes (glicocálice). O glicocálice é formado por filamentos de natureza polissacarídica e proporciona uma firme adesão do biofilme, além de atuar como uma barreira física protegendo os microrganismos da ação dos agentes bactericidas (VEERACHAMY et al., 2014).

A maturação do biofilme ocorre de 3 a 6 dias após adesão inicial e confere uma maior estabilidade e aumento da densidade populacional dos microrganismos. Este fenômeno ocasiona uma pronunciada produção do glicocálice, levando ao aumento da espessura do biofilme. Nesta fase, as células bacterianas estão bem diferenciadas, com diversos genes ativos e produção de inúmeras substâncias. Existe ainda uma alteração fenotípica de células planctônicas (vida livre) para a forma sésil (aderidas).

De 9 a 12 dias após adesão inicial, ocorre a fase de desprendimento. Algumas células bacterianas se destacam do biofilme, podendo haver colonização e início da formação de um novo biofilme em uma nova área ou superfície (VEERACHAMY et al., 2014) (**Figura 5**).

A infecção com formação de biofilme continua a ser uma das principais causas de falha em implantes. Sabe-se que o biofilme bacteriano pode colonizar tanto a superfície tecidual do paciente como a superfície dos dispositivos médicos implantados. Esta infecção, conseqüentemente, leva a destruição do tecido, disseminação sistêmica do agente patogênico e disfunção do dispositivo, o que pode resultar em doença grave e morte (HALL-STOODLEY et al., 2004). Os principais microrganismos responsáveis pela formação de biofilme em dispositivos médicos são bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus viridans*) e bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*), bem como leveduras (DAVEY et al., 2000, SPEZIALE et al., 2014).

Figura 5 – Representação esquemática da formação de biofilme



Fonte: Adaptado de Veerachamy (2014).

Legenda: (1) Adesão; (2) Proliferação; (3) Maturação; (4) Desprendimento.

As infecções associadas a implantes biomédicos são resistentes aos mecanismos do sistema imune e difíceis de tratar com antibióticos porque os microrganismos estão dentro de um microambiente protegido que dificulta a prevenção e tratamento dessas infecções. Vários esforços têm sido realizados no sentido de eliminar e reduzir as infecções nos implantes médicos (ROMANÒ et al., 2015). No entanto, infecções microbianas já foram observadas em quase todos os dispositivos médicos ou implantes como próteses, válvulas cardíacas, implantes ortopédicos, implantes dentários, cateteres, bomba artificial, dispositivos de assistência ventricular esquerda, marca-passos cardíacos, próteses vasculares, cateteres urinários, próteses de voz, próteses oculares, lentes de contato, e dispositivos intrauterinos (BLAKER; NAZHAT; BOCCACCINI, 2004; RODRIGUES; BANAT; TEIXEIRA, 2007).

Os danos teciduais e a formação de coágulos associados ao processo cirúrgico estão relacionados com as taxas aumentadas de colonização microbiana por biofilme. As infecções trazem consigo outros desafios clínicos incluindo a inflamação crônica, dificuldades de cicatrização, a rápida resistência aos antibióticos e a propagação de êmbolos infecciosos. Além disso, nos casos de próteses ortopédicas, podem levar a uma condição de osteomielite com efeitos perturbadores sobre o osso e os tecidos moles circundantes que não respondem a quaisquer tratamentos com antibióticos convencionais (VEERACHAMY, 2014).

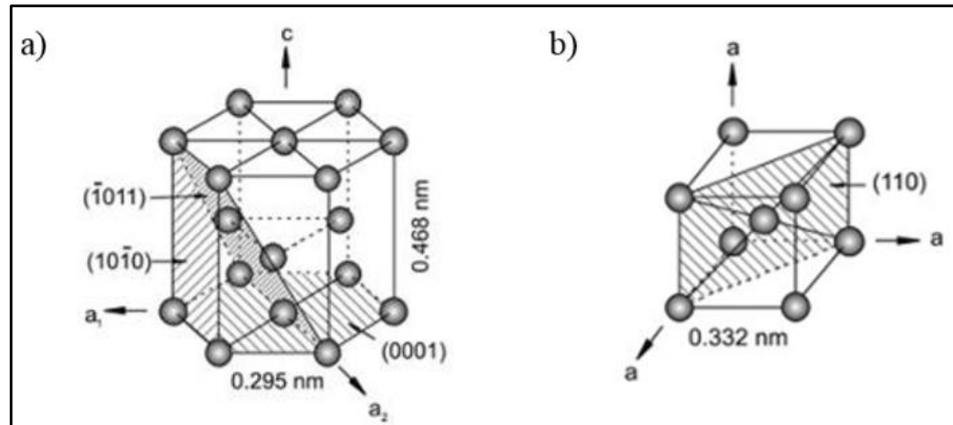
Uma vez que a contaminação do ambiente cirúrgico é uma realidade que não pode ser contornada, a criação de superfícies que impeçam a adesão, colonização e dispersão das bactérias apresenta-se como uma alternativa para o sucesso de intervenções e utilização de aparatos médicos na prática clínica. Fica claro que tanto células do hospedeiro quanto

bactérias competem pela superfície do implante. Desta forma, se as células do hospedeiro colonizam o implante antes das bactérias, a probabilidade de que estas últimas possam aderir passa ser muito baixa. No entanto, quando se trata de habilidade de sobrevivência em qualquer superfície sintética, estes microrganismos possuem uma grande margem de vantagem na “corrida” pelo substrato quando comparados com as células do hospedeiro. Além do mais, as bactérias apresentam uma série de proteínas adesivas que podem se ligar a uma vasta gama de superfícies (GALLO et al., 2014). Fica claro, portanto, que o desenvolvimento de superfícies com propriedades antimicrobianas é essencial para uma alta qualidade dos implantes (MEI et al., 2014). Vários estudos têm objetivado a incorporação de substâncias antibióticas na superfície de implantes. Todavia, a maioria destes esforços falham em manter uma ação antibacteriana sustentável, principalmente no ambiente oral. Além do mais, a liberação de substâncias antibacterianas causa preocupação quanto a sua toxicidade ao hospedeiro, além de induzirem o aparecimento de cepas resistentes (MEI et al., 2014). Dentro desse panorama, a prata tem sido apontada como promissora, pois ao contrário dos antibióticos, esse metal age de maneira não específica sobre uma grande quantidade de microrganismos, incluindo bactérias e fungos.

1.4 Titânio como biomaterial

O titânio é o quarto metal mais abundante da crosta terrestre, não sendo encontrado puro na natureza, mas associado a minerais como TiO_2 , sob a forma de Rutilo ou Anatásio, e Ilmenita. Quando o titânio está na forma de TiO_2 ele apresenta uma estrutura cristalina hexagonal compacta (hcp – *hexagonal closed packed*) referente à fase α , que pode sofrer uma modificação alotrópica a $883^\circ C$ para a estrutura cúbica de corpo centrado (bcc – *body centered cubic*), conhecida como fase β (**Figura 6**). A manipulação destas características cristalográficas por adição de ligantes e processos termomecânicos permite a obtenção de ligas com as mais variadas propriedades. A estrutura hexagonal compacta lhe confere elevada ductilidade devido à facilidade em formar maclas – volume do material cuja orientação é imagem especular da orientação da matriz – em vários planos cristalográficos (CALLISTER, 2009).

Figura 6 – Formas cristalográficas do titânio



Fonte: Callister (2009).

Legenda: (a) Forma hexagonal compacta, α ; (b) Forma cúbica de corpo centrado, β .

O titânio comercialmente puro (Ti cp) é classificado em 4 graus de pureza de acordo com a porcentagem de elementos intersticiais (nitrogênio, hidrogênio, ferro, oxigênio e carbono). O Ti cp grau 1 apresenta maior formabilidade e resistência a corrosão, enquanto o Ti cp grau 4 possui alta resistência mecânica e menor resistência a corrosão em função da maior quantidade de oxigênio intersticial. O Ti cp grau 2 é o mais utilizado na área médica por possuir maior resistência mecânica que o Ti cp grau 1 e possuir semelhante resistência a corrosão (ARCAM EBM SYSTEM, 2008). As ligas podem ser constituídas somente por titânio puro, mas na grande maioria das vezes é adicionado alumínio (6%) e vanádio (4%), os quais melhoram as forças de tensão destas ligas.

Em 1952, o cirurgião ortopédico sueco Per-Ingvar Brånemark investigava a circulação sanguínea em tíbias de coelhos através das microcâmaras de titânio quando observou que estas não podiam ser removidas devido à forte aderência entre o osso neo-formado e a superfície do metal. A partir desta observação iniciou-se a investigação do uso do titânio como biomaterial, sendo aplicado pela primeira vez em 1965 em implante de prótese dentária (McCLARENCE, 2003).

O titânio e suas ligas têm sido usados na fixação de fraturas e reconstruções de articulações, pois preenchem a maior parte dos requisitos necessários às aplicações biomédicas: resistência à corrosão, biocompatibilidade, bioadesão, módulo de elasticidade, resistência à fadiga e boa processabilidade (KULKARNI et al., 2015). Além disso, apresentam forte tendência de osseointegração, sendo esta característica importante para implantes de *interfacing* de longa duração. Atualmente o titânio e suas ligas são os metais mais utilizados na fabricação de biomateriais metálicos, sendo matéria prima para a produção

de próteses de reposição de tecidos duros (dentárias, ortopédicas e placas de reconstrução maxilo-facial) e em aplicações cardiovasculares e cardíacas (marcapassos e válvulas cardíacas) (KULKARNI et al., 2015; RENZ, 2007,).

A excelente biocompatibilidade do titânio se deve à formação espontânea de uma camada de óxido em sua superfície, constituída em sua maior parte de TiO_2 , morfológicamente homogênea e com espessura entre 1,5-10 nm (DAVIS, 2003; SUL et al., 2001). Além disso, esta camada atua como proteção à superfície do metal, oferecendo resistência ao processo de corrosão (GITTENS et al., 2014; YASZEMSKI et al., 2004). A camada de óxido, que é uma cerâmica por natureza, tem sido apontada como responsável pela boa performance do titânio por mimetizar as propriedades da hidroxiapatita no osso (GITTENS et al., 2014)

Nos implantes cirúrgicos, o titânio puro e a liga Ti-6Al-4V são as mais empregadas. Apesar disso, estudos têm mostrado certa toxicidade neurológica associada ao alumínio e vanádio presente nesta liga. Além disso, próteses constituídas por esse material formam óxido de vanádio em suas superfícies. Sendo este último termodinamicamente instável, há discussões sobre a sua toxicidade quando presente no organismo. Alguns pesquisadores afirmam que este óxido pode irritar o sistema respiratório, chegando até mesmo a comprometer o funcionamento dos pulmões (ORÉFICE et al., 2002). A grande desvantagem do titânio é a sua fraca resistência ao desgaste por uso, tornando-o inaplicável em locais de articulação com carga, sem que haja algum tipo de modificação na sua superfície de modo a conseguir maior resistência.

1.5 Modificação de Superfícies em Biomateriais

A modificação de superfícies dos materiais para aplicações biomédicas possibilita a combinação de propriedades do volume do material com as propriedades de superfície desejadas, como biocompatibilidade, bioatividade, resistência mecânica, dentre outras. Esta combinação visa otimizar o desempenho do sistema, minimizando simultaneamente as perdas funcionais decorrentes da substituição do tecido ou órgão lesado pelo biomaterial implantado (ORÉFICE et al., 2012). Tendo em vista que certas condições do paciente, tais como idade avançada, baixa qualidade da matriz óssea e tabagismo, podem influenciar sobremaneira o sucesso da cirurgia de implantes, deve-se planejar cuidadosamente estes implantes de tal maneira que os efeitos das variáveis nos pacientes sejam mínimos (GITTENS et al., 2014).

Propriedades superficiais podem ser alteradas com revestimentos que possuam as características desejadas, mudando a composição ou removendo materiais indesejados da superfície do implante. É preciso ter em mente que os tratamentos superficiais devem mudar apenas a composição, estrutura e morfologia da superfície, enquanto as propriedades do interior do material permanecem inalteradas. Os métodos de modificação de superfícies são classificados em três grupos principais: métodos físico-químicos, métodos biológicos e os métodos de recobrimento.

- a) **Método físico-químico:** A funcionalização ou modificação química é a mais abrangente, no tocante às variações e possibilidades. Geralmente é realizada a imobilização de um ou mais grupos químicos na superfície do biomaterial a ser modificado;
- b) **Método biológico:** São utilizadas biomoléculas, geralmente macromoléculas, das classes das proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos ou compósitos moleculares (glicoproteínas, lipoproteínas);
- c) **Método de Recobrimento:** Existem diversos processos de modificação de superfícies de materiais a partir da deposição de recobrimentos ou filmes finos. Como exemplos, podemos citar os processos de imersão (*dip coating*), aplicação de filmes por rotação (*spin coating*), eletroquímica e filmes moleculares automontados (*self assembled monolayer*).

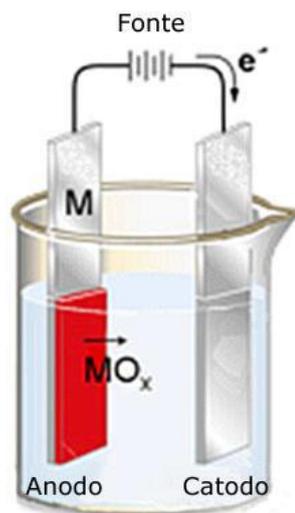
1.5.1 Anodização e Nanotubos de TiO_2

O Ti cp é um material bioinerte necessitando de um tratamento superficial para tornar sua superfície bioativa promovendo a osseointegração. Atualmente, no mercado brasileiro, existem implantes de titânio tratados com ataque ácido, com jateamento (de TiO_2 , fosfato de cálcio, alumina e areia) e via oxidação anódica, como os implantes TiUnite® (da Nobel Biocare) e Vulcano® (da Conexão) (BATISTA et al., 2010).

A anodização, ou oxidação anódica, é um processo eletroquímico de tratamento da superfície que permite preservar todas as qualidades do metal, protegendo-o contra agressividade do meio ambiente, a partir da criação de uma camada de óxido sobre a superfície. A célula eletroquímica é a estrutura utilizada durante o processo, no qual ocorrem reações de oxirredução, permitindo a interconversão de energia elétrica e química. O processo é feito através da utilização de um ânodo de titânio e um cátodo de platina, prata, cobre, aço inoxidável, dentre outros. Na anodização ocorrerá a adsorção dos ânions da solução de

anodização sobre a camada de óxido em formação (**Figura 7**). Este fenômeno desencadeará também outras reações que irão promover o crescimento do óxido de titânio, em um processo complexo onde parâmetros como a natureza do eletrólito, temperatura, densidade de corrente aplicada e velocidade de agitação da solução devem ser considerados (CHANMANCE, 2007; TSUCHIYA et al., 2005; VETTER, 1967; YANG, 2008).

Figura 7 – Representação esquemática do processo de anodização em uma célula de dois eletrodos

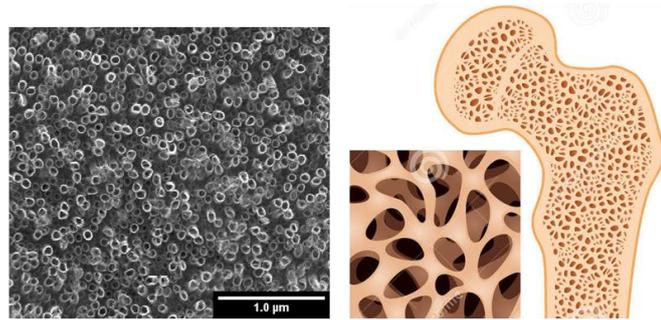


Fonte: Adaptado de Kulkarni (2015).

A anodização resulta na formação de um filme passivo que possui normalmente poucos nanômetros de espessura e diferentes óxidos em sua composição, dentre os quais o TiO_2 é o mais estável. O grande destaque é que a anodização do titânio é capaz de gerar nanotubos, majoritariamente ordenados, com dimensões precisamente controladas, numa geometria que mimetiza a trabécula óssea natural (GONG et al., 2001), além de ser uma técnica simples, versátil e efetiva (MINAGAR et al., 2012; SWAMI; CUI; NAIR, 2011).

Estudos mostram que a presença de relevo nanométrico na superfície do implante melhora quantitativa e qualitativamente a osseointegração em decorrência do aumento da área de contato e da forte interação eletrostática, que é crucial no agrupamento das proteínas de adesão presentes na superfície celular (GONGADZE et al., 2011). Outros estudos demonstram ainda que os implantes de titânio anodizados promovem uma otimização na interação metal/tecido (CHANMANCE, 2007; TSUCHIYA et al., 2005; VETTER, 1967; YANG, 2008). A figura 8 compara a geometria dos nanotubos de TiO_2 obtidos por anodização com a organização da trabécula óssea.

Figura 8 – Comparação entre nanotubos de TiO₂ e a geometria óssea



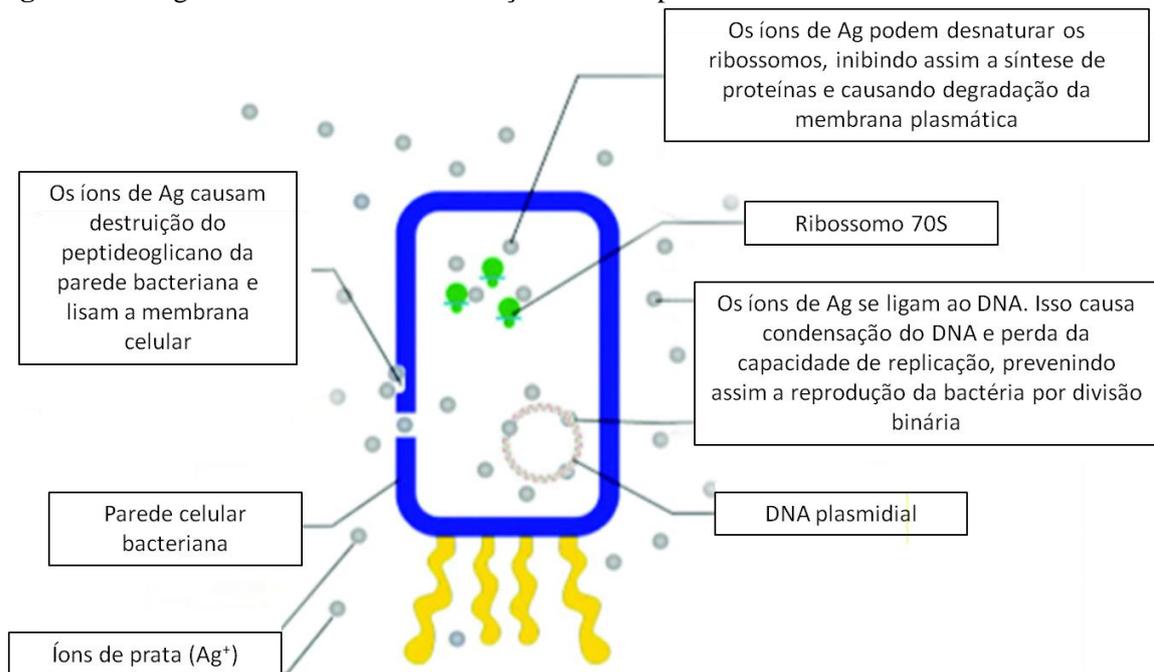
Fonte: Elaborado pela autora

1.5.2 Incorporação de Nanopartículas de Prata

A prata é um metal de transição reconhecido como tendo propriedades antimicrobianas e assumiu um papel importante no tratamento de infecções. Em doses adequadas, a prata não é tóxica para células de mamífero, mas é eficaz contra um largo espectro de espécies de bactérias e fungos, incluindo cepas resistentes a antibióticos (AGARWAL; WEIS; SCHURR, 2010; CAO; LIU, 2010; SAMBHY et al., 2006). A prata e as nanopartículas de prata têm sido utilizadas em uma variedade de aplicações industriais, médicas e domésticas (ANSARI; KHAN; KHAN, 2014; PHILLIPS; YANG; DAVIS, 2013). O potencial clínico da nanotecnologia da prata é de particular interesse para o campo biomédico, onde a infecção de dispositivos implantados representa uma ameaça persistente. Embora o efeito antibacteriano das nanopartículas de prata tenha sido amplamente descrito, o seu mecanismo de ação não foi totalmente elucidado.

A atividade bactericida potente e de largo espectro contra microrganismos morfológica e metabolicamente diferentes parece estar relacionada com um mecanismo de interação multifacetado entre as nanopartículas e os microrganismos (FRANCI et al., 2015). Estudos *in vitro* têm mostrado que os íons prata liberados se ligam às estruturas das células bacterianas, incluindo a parede celular de peptidoglicano, membrana plasmática, DNA e proteínas (**Figura 9**) (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010).

Figura 9 – Diagrama dos mecanismos de ação dos íons prata em bactérias



Fonte: Adaptado de Brennan et al. (2015).

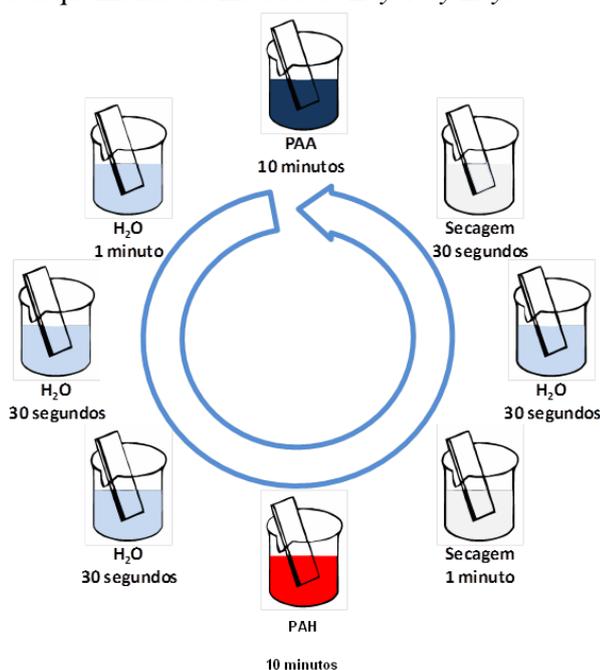
Há três mecanismos diferentes através dos quais a prata exerce seus efeitos tóxicos sobre bactérias:

- a) A ligação dos íons na parede celular externa provoca a perda de conteúdo celular, criando anomalias estruturais (YAMANAKA; HARA; KUDO, 2005). Como as bactérias Gram-positivas têm paredes celulares espessas, uma maior concentração de prata é necessária para evitar o crescimento destas do que para as bactérias Gram-negativas.
- b) A interação com grupos sulfidríla (SH) em proteínas e enzimas bacterianas prejudica muitas funções celulares essenciais, como a respiração e a permeabilidade. A ligação ao DNA celular impede a reprodução (CHALOUPKA et al., 2010).
- c) Os íons de prata podem desnaturar os ribossomos, inibindo a síntese de proteína e causando degradação da membrana plasmática.

As nanopartículas de prata na superfície de implantes biomédicos impedem a adesão bacteriana e formação de biofilme. Como resultado, a prata tem sido incorporada na superfície de uma variedade de dispositivos médicos, tais como cateteres vasculares, urinários, enxertos, suturas cirúrgicas e dispositivos para fixação de fratura. Para esta finalidade, nanopartículas podem ser sintetizadas por diversas rotas e incorporadas à superfície de biomaterias, sendo depositadas diretamente sobre a superfície do dispositivo, ou aplicadas em um revestimento superficial polimérico (MEI et al., 2014).

Dentre os revestimentos poliméricos, destaca-se o método *Layer by Layer* (LbL) que envolve a deposição de eletrólitos fracos a partir de soluções aquosas diluídas, baseado nas interações eletrostáticas de polímeros de cargas opostas sobre um substrato específico (**Figura 10**).

Figura 10 – Representação esquemática do método de *Layer by Layer*



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O processo de produção dos filmes automontados se inicia com a imersão do substrato em um dos polímeros (PAA), seguida de secagem, lavagem em água destilada, nova secagem e no polímero de carga oposta (PAH). Os substratos passam por novas secagens e lavagem antes de iniciarem um novo ciclo. Os tempos de incubação e os polímeros utilizados podem ser adaptados de acordo com cada protocolo. PAA: ácido poliacrílico; PAH: hidrocloreto de polialilamina.

O LbL pode adsorver íons, como por exemplo os da prata, e serem reduzidos por luz UV. A grande vantagem deste método é a possibilidade de controle do tamanho das partículas formadas. Além disso, as nanopartículas exibem várias vantagens tais como, área superficial específica, alta proporção de átomos na superfície e eficiente propriedade antibacteriana.

1.5.3 Lectinas

O termo “lectina” (do latim *lectus*, significa selecionado, escolhido) foi proposto por Boyd e Shapleigh em 1954 para designar um grupo de proteínas que apresentava a característica comum de seletividade na interação com carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME 1995). As lectinas apresentam as mais variadas funções: hormonal, enzimática,

defesa, nutricional, receptores de sinais celulares, proteínas de transporte bem como funções estruturais (SHARON; LIS 2004). O termo aglutinina é usado como sinônimo para lectina, em referência à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (PEUMANS; VAN DAMME 1995). Porém, a definição de lectina mais completa foi formulada por Kocourek e Horejsi (apud JAMES, 1985). De acordo com estes autores lectinas são proteínas não pertencentes ao sistema imunológico, porém capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se reversivelmente a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios (PEUMANS; VAN DAMME 1995, PEUMANS et al. 2001).

A capacidade hemaglutinante está limitada ao evento de ligação aos resíduos de aminoácidos que compõem as glicoproteínas e glicolipídeos da superfície da membrana celular chamados de Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (*CRD*, do inglês- *Carbohydrate Recognition Domain*) (SHARON; LIS, 2004; TSUTSUI et al., 2006). A especificidade e a força com a qual o CRD se liga aos sacarídeos é o elemento chave da sua função biológica (GAUTO et al., 2011) e tem sido de grande valia para o campo da imunologia, biologia celular e da engenharia genética (SHARON; LIS, 2004). Inicialmente, as lectinas foram identificadas no reino vegetal, mas possuem ampla distribuição na natureza, sendo encontradas desde microrganismos até em animais (POHLEVEN; ŠTRUKELJ; KOS, 2012).

Por possuírem sítios específicos de ligação a carboidratos, as lectinas são capazes de interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e receptores de superfície celular, agindo como decodificadores das informações trocadas entre moléculas, células e organismos (MISQUITH; RANI; SUROLIA, 1994). Desta forma, estas proteínas vêm sendo utilizadas na investigação científica como uma ferramenta útil na avaliação e no entendimento de diversos sistemas biológicos. Vários estudos têm demonstrado o potencial biológico de diversas lectinas como atividade antifúngica (BAINS et al., 2005), antimicrobiana (CARVALHO et al., 2012), antivirais (BAINS et al., 2005), antibacteriana (NUNES et al., 2011), inseticida (MACEDO et al., 2007), mitogênica (MACIEL et al., 2004), proliferativa (MELO; CASTRO; OLIVEIRA, 2010), cicatrizante (MELO et al., 2011), antitrombótica e anticoagulante (SILVA et al., 2012). As lectinas são utilizadas também na detecção de sorotipos do vírus da dengue (OLIVEIRA et al., 2011) e no tratamento de queimaduras de segundo grau (PEREIRA et al 2012). Estas características mostram o amplo espectro de investigações promissoras em diversos sistemas biológicos, demonstrando o potencial biotecnológico destas proteínas.

A lectina adquirida do soro de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), OniL, foi purificada e caracterizada por Silva et al. (2012). OniL é uma lectina com afinidade a resíduos de glicose e manose, mais especificamente a metil- α -D-manopiranosídeo, apresenta características ácidas e sua atividade é aumentada na presença de íons Ca^{2+} . A OniL apresenta atividade imunomoduladora e mitogênica em esplenócitos de camundongos. A recente purificação e caracterização da OniL permite uma investigação pioneira do potencial desta lectina em diversas áreas da biotecnologia (SILVA et al. 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Em função de doenças como osteoporose, artrite, câncer ou de traumas, há muitas vezes a necessidade de intervenção cirúrgica para substituição ou reconstrução óssea total ou parcial, além de fixação definitiva ou temporária de ossos. Para atender a todas essas necessidades, o mercado de implantes ortopédicos compreende artefatos com variadas aplicações. As principais são: reconstrução (joelho, quadril e ombro), coluna cervical (fixadores e reposição), trauma (fixadores internos e externos) e materiais bioabsorvíveis (integração óssea). Estima-se que o mercado global de implantes ortopédicos tenha alcançado US\$ 30,5 bilhões em 2012, devendo atingir cerca de US\$ 46,5 bilhões até 2017, com um crescimento médio esperado de mais de 8% ao ano. No Brasil, o mercado de implantes ortopédicos foi de US\$ 538 milhões em 2012, respondendo por cerca de 6,5% do mercado de equipamentos médicos. Com um crescimento médio esperado de 15% nos próximos anos, estima-se que o mercado de implantes ortopédicos alcance US\$ 820 milhões neste ano de 2015 (LANDIM et al., 2013). Entre 2010 e 2011, o número de cirurgias ortopédicas no SUS mais do que dobrou, chegando a cerca de 300 mil neste período. Estima-se que destas, cerca de 20 mil sejam procedimentos para implantes ortopédicos (CINCO..., 2012). Atualmente, alguns tipos de implantes ortopédicos tem um tempo médio de vida de 10-15 anos, necessitando ser substituídos após esse período (YAO, 2005). A implantodontia por sua vez, atende um mercado de 2,2 milhões de implantes dentários realizados anualmente no Brasil.

Os esforços de Pesquisa & Inovação convergem para desenvolvimento de materiais cada vez mais específicos para as aplicações a que se destinam, permitindo o aumento da vida útil do implante e a redução de complicações pós-operatórias. As principais tendências tecnológicas são: (a) o revestimento com fármacos, que potencializam o efeito do implante; (b) o desenvolvimento de implantes inteligentes, que reconhecem e reagem a estímulos do organismo; e (c) os implantes bioabsorvíveis, materiais especiais que são absorvidos pelo organismo depois de determinado prazo. Assim, engenharia de materiais, nanotecnologia, mecânica de precisão e microeletrônica podem contribuir para o desenvolvimento de materiais com características e funções aprimoradas (LANDIM et al., 2013).

Com base nessas necessidades, os nanotubos de TiO_2 sintetizados por anodização do Ti cp são uma alternativa muito interessante para produzir os implantes por apresentarem diversas vantagens sobre as próteses utilizadas atualmente. O sucesso destes dispositivos nanoestruturados deve-se principalmente ao baixo custo e a maior área superficial, o que

contribui para uma melhor adesão e proliferação celular e, conseqüentemente, melhor osseointegração.

Para suplantiar os riscos de infecções associadas ao procedimento cirúrgico de implantação das próteses, a incorporação de nanopartículas de prata aos nanotubos de TiO_2 sugere a criação de um ambiente com ação bactericida. Para a síntese dessas nanopartículas, o método *LbL* é proposto por permitir o controle do tamanho das nanopartículas de prata pela seleção da luz utilizada no processo de fotorredução, e visa garantir uma liberação constante e localizada de íons prata.

Em paralelo, a incorporação de macromoléculas de origem biológica, como por exemplo lectinas, à superfície nanotubular do titânio, busca trazer em um único composto a melhoria na biocompatibilidade do material com a disponibilidade de um ambiente com propriedades bactericidas. Esta linha de pesquisa, aliando biomateriais à produtos naturais, tem um caráter inovador e de grande impacto biotecnológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a biocompatibilidade e a atividade bactericida de nanotubos de dióxido de titânio (TiO_2) impregnados com nanopartículas de prata ou com a lectina OniL.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Sintetizar e caracterizar nanotubos de TiO_2 impregnados com nanopartículas de Ag (NT-Ag);
- b) Sintetizar e caracterizar nanotubos de TiO_2 impregnados com OniL (NT-OniL);
- c) Avaliar a adesão de osteoblastos humanos sobre os NT-Ag e NT-OniL;
- d) Avaliar a citotoxicidade das amostras de NT-Ag e NT-OniL sobre osteoblastos;
- e) Avaliar o potencial osteogênico dos osteoblastos humanos sobre as amostras NT-Ag e NT-OniL;
- f) Avaliar a atividade bactericida dos NT-Ag e NT-OniL.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese das amostras

As amostras foram fabricadas a partir de folhas de titânio de 0,5 mm de espessura com grau de pureza de 99.6%. Antes da anodização, as folhas passaram por um processo de limpeza, com detergente neutro e acetona e, posteriormente, foram secas à temperatura ambiente. Os nanotubos de TiO₂ foram formados pelo processo de anodização com eletrólito a base de 89.3% de etilenoglicol/10% de água destilada/ 0,7% de fluoreto de amônia, sob um potencial de 30V por 30 minutos a 2A. As amostras foram anodizadas com uma relação de área entre os eletrodos de Ti/Cu de 1:1, com uma rampa de tensão de subida de 5 segundos e descida 2 segundos (S5sD2s), à temperatura ambiente. Após a anodização as amostras foram lavadas com água destilada por 2 minutos em ultrasonicador.

As amostras anodizadas foram tratadas termicamente a 400°C por 3 h em pressão atmosférica ambiente com taxa de aquecimento e resfriamento de 10°C/minuto, com o objetivo de cristalizar os nanotubos na fase anatase. Após o processo, a folha de titânio foi cortada em quadrados de 1cm².

4.1.1 Negativação da superfície nanotubular

A fim de funcionalizar as amostras para que estas apresentassem uma carga negativa em sua superfície, as amostras foram incubadas por 10 minutos em uma solução etanólica de hidróxido de sódio (NaOH) à 10% seguida de 3 lavagens, de 2 minutos cada, em água destilada.

4.1.2 Incorporação de nanopartículas por Layer by Layer

Os nanotubos de TiO₂ foram impregnados com nanopartículas de prata (Ag) pelo método de automontagem *Layer by Layer* (LbL). A deposição foi realizada de forma automatizada utilizando o equipamento StractoSequence VI (NanoStrata Inc.). Para a formação dos filmes finos foram preparadas soluções aquosas de PAH (Hidrocloreto de Polialilamina) e PAA (Ácido Poliacrílico), ambos com concentração de 0,01M e pH 3.5. O procedimento consistiu na deposição de 12, 10 ou 8 camadas de PAH e PAA sobre as

amostras nanotubulares de TiO₂ negativadas. Posteriormente as amostras foram imersas em uma solução aquosa de acetato de prata à 7 mM durante 1 hora e, então, removidas e lavadas 3 vezes em água destilada durante 1 minuto, cada lavagem. A redução da Ag foi efetuada sob radiação UV (365nm) com a exposição durante períodos de 12 e 24 horas, para a obtenção de nanopartículas de Ag com diferentes tamanhos.

4.1.3 Funcionalização com a lectina OniL por Spin Coating

O método de *spin coating* resume-se em depositar gotas da solução desejada sobre um substrato que apresenta um movimento de rotação. O fluido é então espalhado, devido à força centrípeta levando a formação de um filme fino sobre a amostra. A lectina OniL, obtida do soro de tilápias (*Oreochromis niloticus*), foi purificada, caracterizada e gentilmente cedida pela Dra. Cynarha Cardoso da Silva, do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. A solução estoque foi preparada em solução salina tamponada com Tris (TBS), pH 8,0, em uma concentração de 4,4 mg/mL e armazenada a -20°C, protegida da luz. Para a deposição, a lectina foi diluída em concentrações de 100 e 200 µg/mL em TBS. Os filmes foram preparados através do gotejamento de 100 µL da solução de lectina sobre as amostras de TiO₂ negativadas, numa velocidade de 500rpm seguida de uma aceleração de 2000rpm utilizando o Spin Coater Model WS-650Mz-23 (Laurell Technologies Corporation).

4.2 Caracterização das amostras

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV)

A ultraestrutura das superfícies dos nanotubos de TiO₂ foi analisada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, equipada com feixe de elétrons gerado por emissão de campo (FEG/EDS – Philips QUANTA 200F, com detector EDAX, operado 30 kV, *spot* 5, distância de trabalho 10 mm e *deadtime* entre 20-40).

4.2.2 Difração de Raios X (DRX)

A fase cristalina dos nanotubos de TiO₂ e a Ag foram identificadas utilizando-se um difratômetro de raios X (Bruker-AXS modelo D8Advance). As medidas de difração foram

coletadas a temperatura ambiente na geometria Bragg-Brentano θ - 2θ , em um intervalo de 10° a 50° , em ângulo rasante de $0,5^\circ$, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), utilizando um passo angular de $0,05^\circ$ e tempo de integração de 2 segundos por ponto. Os difratogramas obtidos foram comparados com as fichas cristalográficas correspondentes e confrontados com dados anteriores de nosso grupo obtidos no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS).

4.2.3 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A determinação de Ag nas amostras foi feita por ICP-MS empregando um espectrômetro modelo Elan DRC II (PerkinElmer-SCIX). Previamente à etapa de determinação, as amostras (aproximadamente 5 mg) foram decompostas diretamente em frascos de polipropileno. Para a decomposição foram utilizados 2 mL de HNO_3 e 350 μL de HF. Os frascos foram agitados manualmente e mantidos em repouso até a completa decomposição. Em seguida, o conteúdo dos frascos foi avolumado a 25 mL com água ultrapura. As medidas foram feitas utilizando o isótopo ^{107}Ag .

4.2.4 Medidas Eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas aplicadas nesse trabalho foram voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Ambas as técnicas são bastante utilizadas para monitoramento e modificações ocorridas na interface eletrodo/solução possibilitando medir propriedades elétricas para extrair informações de sistemas biológicos, como por exemplo, a adsorção de proteínas.

Neste trabalho, as medidas eletroquímicas para VC e EIE foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab (Metrohm PGSTAT 128) com módulo de impedância eletroquímica, sendo controlado pelo *software* NOVA 1.11. Uma célula eletroquímica para placas planas foi usada nas medidas contendo três eletrodos: um eletrodo helicoidal de fio de platina como auxiliar, um disco de titânio como eletrodo de trabalho e como referência, um eletrodo de Ag/AgCl (3M em KCl) conectado à solução através de um capilar de Luggin. O eletrodo de trabalho foi pressionado contra um *O-ring* de vedação no lado externo da célula expondo uma área interna de $\sim 1 \text{ cm}^2$. As amostras analisadas por VC e EIE foram: eletrodo com nanotubos de TiO_2 (NT- TiO_2); eletrodo com NT- TiO_2 após negativação (NT-Neg) e NT-Neg após incubação com a lectina OniL (NT-OniL).

A técnica de VC foi realizada na faixa de potencial de -0,5 a 0,5 V e varredura de 100 mv.s^{-1} e a técnica de EIE na faixa de frequência de 0,1 Hz a 1 MHz, amplitude de 10 mV e 10 pontos por década. Foi utilizada uma solução de 10 mM de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (ferri/ferro 1:1) como uma sonda redox para todos os experimentos, pois tem a função de indicar um possível bloqueio na superfície do eletrodo de trabalho.

4.2.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram obtidos entre 4000 e 1000 cm^{-1} com um espectrômetro de infravermelho FT-IV Bruker modelo Vetex 70 por ATR empregando um cristal de Germânio. Os sinais foram calculados sobre 16 *scans*, com resolução de 4 cm^{-1} . Antes da aquisição de cada espectro da amostra, o cristal ATR foi limpo usando acetona e então realizado um espectro chamado “branco”, empregando o cristal sem amostra.

4.3 Avaliação da Biocompatibilidade

4.3.1 Cultivo de Osteoblastos

Para o desenvolvimento dos testes de biocompatibilidade, a linhagem celular de osteosarcoma HOS (ATCC® CRL-1543™) foi utilizada como modelo de comportamento de células osteoblásticas humanas. As células foram mantidas a 37° C, em atmosfera com 5% de CO_2 em meio MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. Culturas confluentes foram tratadas com solução de Tripsina 0,5% - EDTA 0,025% por 5 minutos a 37°C. Após este tempo, as células desprendidas foram coletadas e a ação proteolítica da tripsina inibida pela adição de SFB, contido no meio de cultivo fresco. Em seguida, a suspensão foi centrifugada e o *pellet* ressuspensionado em meio de cultivo. A densidade celular da suspensão obtida foi estimada por contagem em câmara de Neubauer. Para os ensaios biológicos foi usada uma densidade de 1×10^5 células/ mL suspensa em meio MEM que foram distribuídas sobre as amostras em placas de 24 poços e incubadas à 37°C e 5% CO_2 por diferentes intervalos de tempo. Previamente à incubação com as células, as amostras foram esterilizadas por 15 minutos em autoclave à 121°C e 1 atm. As amostras contendo lectina foram esterilizadas por exposição à UV por 10 minutos.

4.3.2 Avaliação Morfológica

Com o intuito de observar a morfologia dos osteoblastos cultivados sobre as diferentes superfícies, as células HOS foram incubadas sobre as diferentes amostras por períodos de 24, 48 e 72 horas. Após a incubação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS), fixadas em solução de 2,5% glutaraldeído em 0,1M tampão cacodilato de sódio por duas horas e pós-fixadas em uma solução de 1% tetróxido de ósmio+0,8% ferricianeto de potássio+5mM de CaCl₂ em 0,1M tampão cacodilato de sódio por 1 hora, no escuro. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 3x 100%), secas em aparelho de ponto crítico, metalizadas com ouro(20 nm) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (FEG/EDS – Philips QUANTA 200F, com detector EDAX).

4.3.3 Teste de Adesão

A fim de avaliar a adesão dos osteoblastos sobre as diferentes superfícies, os mesmos foram levados a interagir com as amostras por períodos de 24, 48 e 72 horas. Após a incubação, os sobrenadantes foram aspirados e as células aderidas às superfícies foram lavadas com PBS, fixadas utilizando uma solução de 3,7% formaldeído por 10 minutos e permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 por 5 minutos à temperatura ambiente. A marcação dos filamentos de actina foi feita com rodamina faloidina (Life Technologies Corporation) por 20 minutos, seguida de duas lavagens com PBS à temperatura ambiente. A marcação do núcleo foi feita com de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen) por 5 minutos, seguida de mais duas lavagens com PBS em temperatura ambiente. As amostras foram visualizadas no microscópio de fluorescência ZEISS Observer Z.1 ApoTome. A quantificação do número de células aderidas sobre a superfície de cada amostra foi feita por contagem dos núcleos, identificados pela marcação com DAPI, utilizando o *software* ImageJ 1.48v. Para tal, foram analisadas imagens de dez campos aleatórios por amostra em um aumento de 100x. O número de células aderidas em cada amostra foi estimado pela média destas contagens.

4.3.4 Avaliação da Viabilidade Celular

A viabilidade das células cultivadas sobre os diferentes substratos foi avaliada através do ensaio de luminescência CellTiter-Glo® (Promega). Este método determina o número de células viáveis em uma cultura com base na quantificação de adenosina trifosfato (ATP) presente, que é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas. Após a incubação das células por 24, 48 e 72 horas sobre as diferentes amostras, 250 µL do reagente CellTiter-Glo foram adicionados a cada poço da placa de 24 poços. O ATP presente no sobrenadante atua na reação de mono-oxigenação da luciferina gerando um sinal luminoso. As placas foram agitadas por 2 minutos e após 10 minutos a luminescência foi determinada no aparelho GloMax (Promega). Os resultados, expressos em mols, foram calculados com base no sinal luminescente de uma curva padrão de ATP.

4.3.5 Atividade da Fosfatase Alcalina

A capacidade das diferentes amostras em induzirem as células crescidas à formarem osso foi avaliada através da detecção da atividade da enzima fosfatase alcalina. Após 24, 48 e 72 horas de incubação com as células, as amostras foram lavadas três vezes com PBS, transferidas para uma nova placa de 24 poços e as células lisadas por 0,5% Triton X-100 através de três ciclos de congelamento/ descongelamento. O lisado celular foi então aspirado e centrifugado a 10.000g por 5 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram coletadas e usadas para quantificação da atividade da enzima utilizando o kit de Fosfatase Alcalina (Labtest). Neste método, a fosfatase alcalina presente na amostra hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional à atividade enzimática, foi medida em $\lambda=590$ nm utilizando o espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific).

A fosfatase alcalina sintetizada pelos osteoblastos foi calculada tomando como referência a absorbância da solução-padrão (45U/L) que foi medida em paralelo com o experimento. Os resultados foram expressos em U/L, unidade que corresponde à quantidade de enzima que liberam por hidrólise, 1 µM de timolftaleína por minuto, por litro de solução nas condições do teste.

4.3.6 Quantificação de Cálcio

O potencial osteogênico das amostras também foi avaliado através da quantificação de cálcio intracelular. Após 72 horas de incubação, as células foram lisadas como descrito anteriormente e o cálcio quantificado através do kit Cálcio Liquiform (Labtest). O método consiste na reação do cálcio com a púrpura de ftaleína em meio alcalino formando um complexo de cor violeta que foi medido em $\lambda=570$ nm.

4.3.7 Avaliação da citotoxicidade das soluções incorporadas

A fim de entender o comportamento das células frente a algumas amostras, foi realizado um estudo citotóxico das soluções incorporadas aos nanotubos: PAA pH = 3,5, PAH pH=3,5 e acetato de prata em diferentes concentrações. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich). Esta técnica tem como princípio a redução do MTT por redutases mitocondriais em células metabolicamente ativas, com a formação de cristais azulados, denominados cristais de formazan, que são solubilizados em DMSO e analisados espectrofotometricamente.

Os osteoblastos foram aderidos em placas de 96 poços por incubação *overnight*. Após esse período, o meio foi removido e as células incubadas por 24, 48 e 72 horas na presença das soluções, que foram previamente diluídas em meio de cultura fresco. Seguente aos períodos de incubação, o meio foi retirado e foram adicionados a cada poço 100 μ l de meio de cultura sem vermelho de fenol suplementando com 10% de SFB e 10 μ l de MTT (5mg/mL). A placa foi incubada novamente em estufa de 37°C e 5% de CO₂, no escuro. Após 3 horas, a solução MTT- meio foi retirada e 100 μ l de DMSO foram adicionados para solubilizar o precipitado. As placas foram agitadas por 15 minutos e a absorbância foi medida a $\lambda=595$ nm no espectrofotômetro. Osteoblastos incubados apenas com meio de cultura foram utilizados como controle.

4.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A atividade bactericida dos nanotubos foi avaliada utilizando os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os microrganismos foram crescidos em caldo BHI (*S. aureus* e *E. coli*) ou caldo Sabouraud (*C.*

albicans) por 18h e 24h, respectivamente à 37°C. Depois foi realizada a padronização dos inóculo por espectroscopia DO = 0.140 a $\lambda=530\text{nm}$ equivalente a 1×10^8 UFC/mL. Em uma placa de 24 poços foram colocados os discos testes e 1,8mL de caldo BHI/Sabouraud e 0,2mL do inóculo previamente padronizado de cada micro-organismo. O sistema foi incubado por 48h a 37°C, em repouso. Após o período de incubação, os discos testes foram retirados dos poços, colocados em tubos falcon contendo solução salina 0,9% estéril (10mL) para lavagem e remoção de células não aderidas. Depois os discos foram novamente transferidos para outro tubo falcon contendo solução salina 0,9% estéril (10mL) e agitados por 30 segundos em vortex para promover a desagregação das células microbianas do biofilme. Depois foi procedido diluição seriada até 10^{-4} da suspensão celular microbiana e plaqueada em meio ágar BHI para as cepas bacterianas e ágar Sabouraud para *C. albicans*. As placas de Petri contendo os microrganismos foram incubadas por 48h a 37°C e depois procedida a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

4.5 Análise Estatística

As análises de caráter quantitativo foram realizadas em dois experimentos independentes em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prisma 5.0. Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores \pm erro padrão da média, submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas ou teste *t* de *student* quando apenas um parâmetro foi comparado entre dois grupos, sendo adotado um nível de significância de $p < 0,05$.

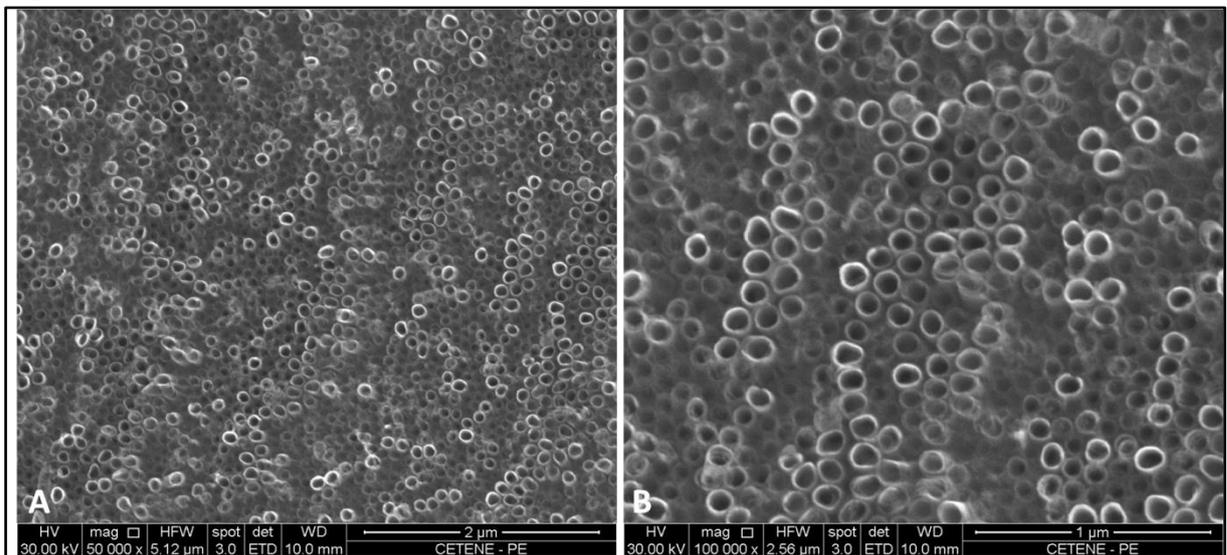
5 RESULTADOS

5.1 Síntese e Caracterização das amostras

As imagens obtidas por MEV comprovam que após a anodização, houve a formação de nanotubos de TiO_2 com uma estrutura nanotubular bem distribuída e organizada (**Figura 11**). A voltagem, a corrente, o tempo de anodização aplicados no experimento, bem como os tempos de descida e subida da rampa de tensão foram selecionados a partir de estudos prévios do grupo de pesquisa (dados não publicados), que buscaram a otimização da técnica a fim de obter uma formação completa e bem definida dos nanotubos de TiO_2 .

Após o processo de anodização, os nanotubos passaram por um tratamento térmico a fim de modificar sua estrutura amorfa para uma estrutura cristalina - que é uma estrutura ordenada em nível atômico. Além de fornecer um sistema mais estável, destacamos que as altas temperaturas atingidas durante este processo servem também para eliminar resquícios de alguns compostos aplicados durante a anodização, como exemplo do flúor, e que poderiam interferir na atividade biológica, sendo tóxicos às células humanas.

Figura 11 – Nanotubos de TiO_2 produzidos pelo processo de anodização.



Fonte: Elaborado pela autora

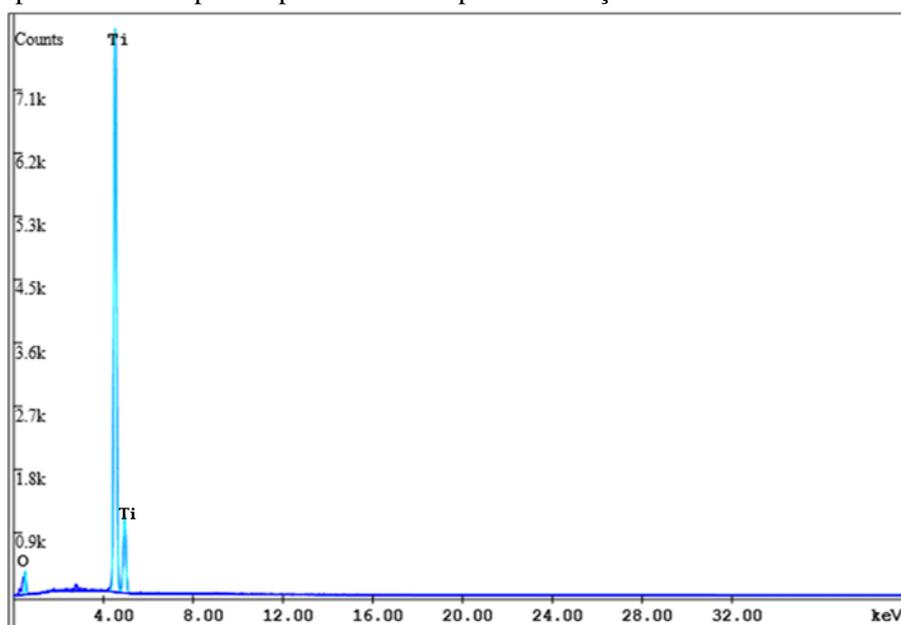
Legenda: MEV de nanotubos de TiO_2 observados transversalmente. **A** – Visão geral; **B** – Detalhe. Barras: A, 2 µm; B, 1 µm.

Com base nas imagens obtidas foi possível mensurar o diâmetro interno dos nanotubos utilizando o *software* Image J. Foram realizadas medidas de diâmetro em 100 nanotubos de

duas regiões distintas da amostra, resultando em um valor médio de $73,8 \pm 8,2$ nm. O controle deste parâmetro é de grande relevância para os testes de biocompatibilidade, visto que pode influenciar diretamente nos processos de adesão e proliferação celular.

Além da obtenção de imagens de alta resolução por MEV, também foi possível realizar a caracterização das amostras em relação a sua composição através da espectroscopia de energia dispersiva (EDS). A figura 12 mostra o espectro correspondente à superfície de titânio após o processo de anodização onde se destacam os picos de titânio (Ti) e oxigênio (O). Estes resultados sugerem a presença de dióxido de titânio (TiO_2), comprovando assim a natureza química dos nanotubos e a ausência de contaminantes.

Figura 12 – Espectro de EDS para superfície de Ti após anodização



Fonte: Elaborado pela autora

5.1.1 Nanotubos de TiO_2 impregnados com Ag

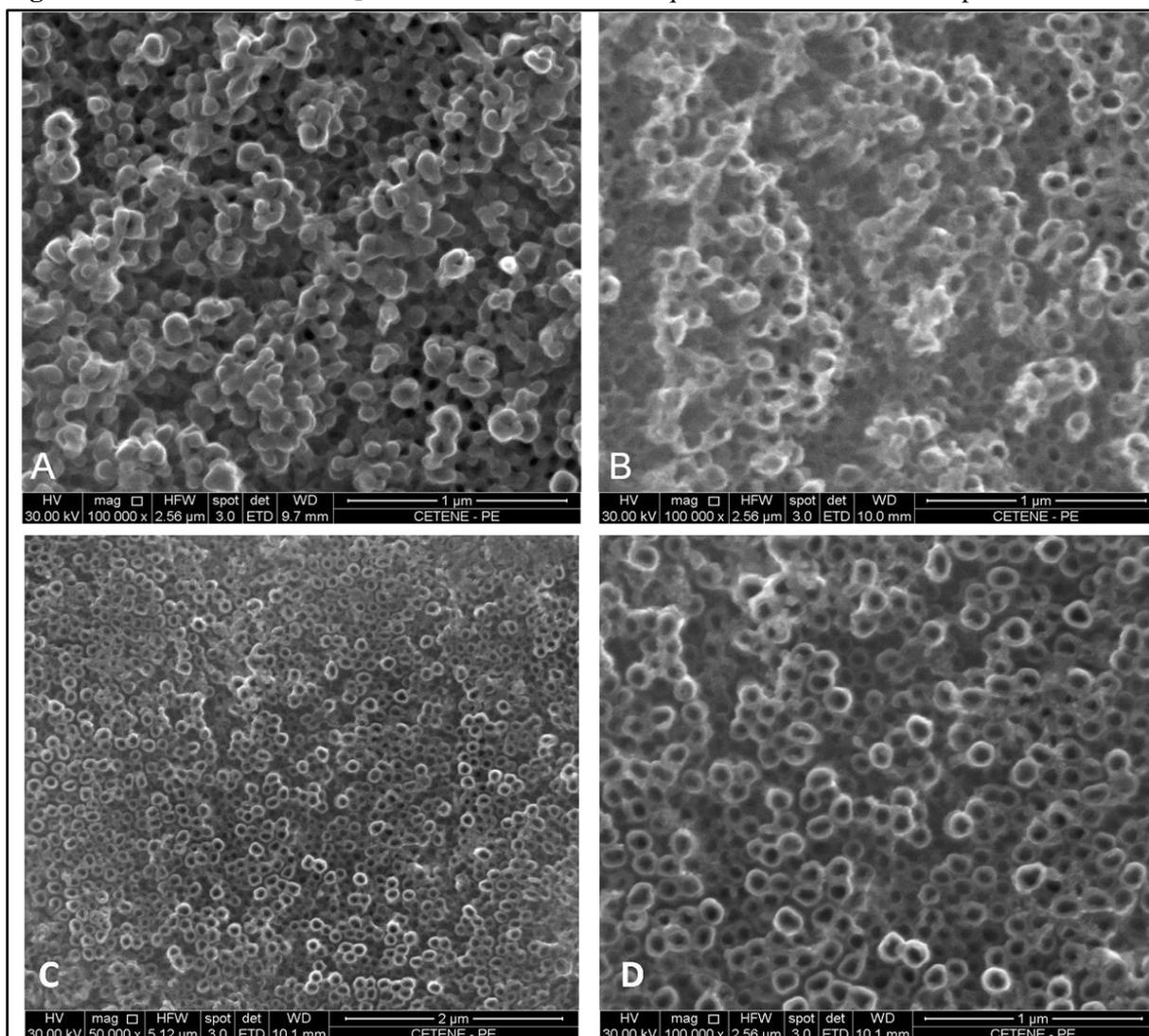
Uma das principais inovações tecnológicas deste trabalho foi baseada na utilização do método de polieletrólitos em multicamadas (LbL) para a síntese das nanopartículas de prata. Este método permite o controle do número de camadas no substrato, bem como do tamanho das nanopartículas de Ag depositadas. Estudos prévios do nosso grupo determinaram que a utilização de ambos os polieletrólitos (PAA/PAH) na condição de pH 3,5 resulta na formação de camadas mais finas (com cerca de $1\mu\text{m}$) devido a um maior relaxamento das cadeias poliméricas e melhor interação entre as mesmas (MACHADO et al., 2009). A deposição de

um filme fino sobre a superfície é necessária para evitar que as camadas de polímeros não interfiram na adesão das células à matriz nanotubular.

Previamente à deposição dos polieletrólitos as amostras de nanotubos foram negativadas com uma solução etanólica de NaOH para que apresentassem uma maior capacidade de ligação ao PAH, primeiro polímero de contato durante o *LbL* e que possui carga positiva. Inicialmente foram depositadas 12 camadas (6 bicamadas) dos polímeros PAA/PAH, seguidas da impregnação por prata. No entanto, ao se observar a superfície destas amostras por MEV, notou-se que este número de camadas era inadequado por ser muito espessa, resultando no recobrimento quase total da matriz nanotubular (**Figura 13A**).

O objetivo de modificar a superfície de titânio com a formação de nanotubos é mimetizar a geometria da trabécula óssea original e aumentar a aderência das células ósseas a essa matriz. Considerando que essa ligação direta ao titânio estaria prejudicada pela densa camada de polímeros formada, foram desenvolvidas amostras com 10 e 8 camadas (5 e 4 bicamadas, respectivamente) e observadas por MEV (**Figura 13B-13C**). As imagens obtidas mostraram que as amostras com 8 camadas não afetavam a morfologia do nanotubos, além de não prejudicar a incorporação da prata (**Figura 13C – 13D**).

Figura 13 – Nanotubos de TiO₂ revestidos com diferentes quantidades de camada de polímeros



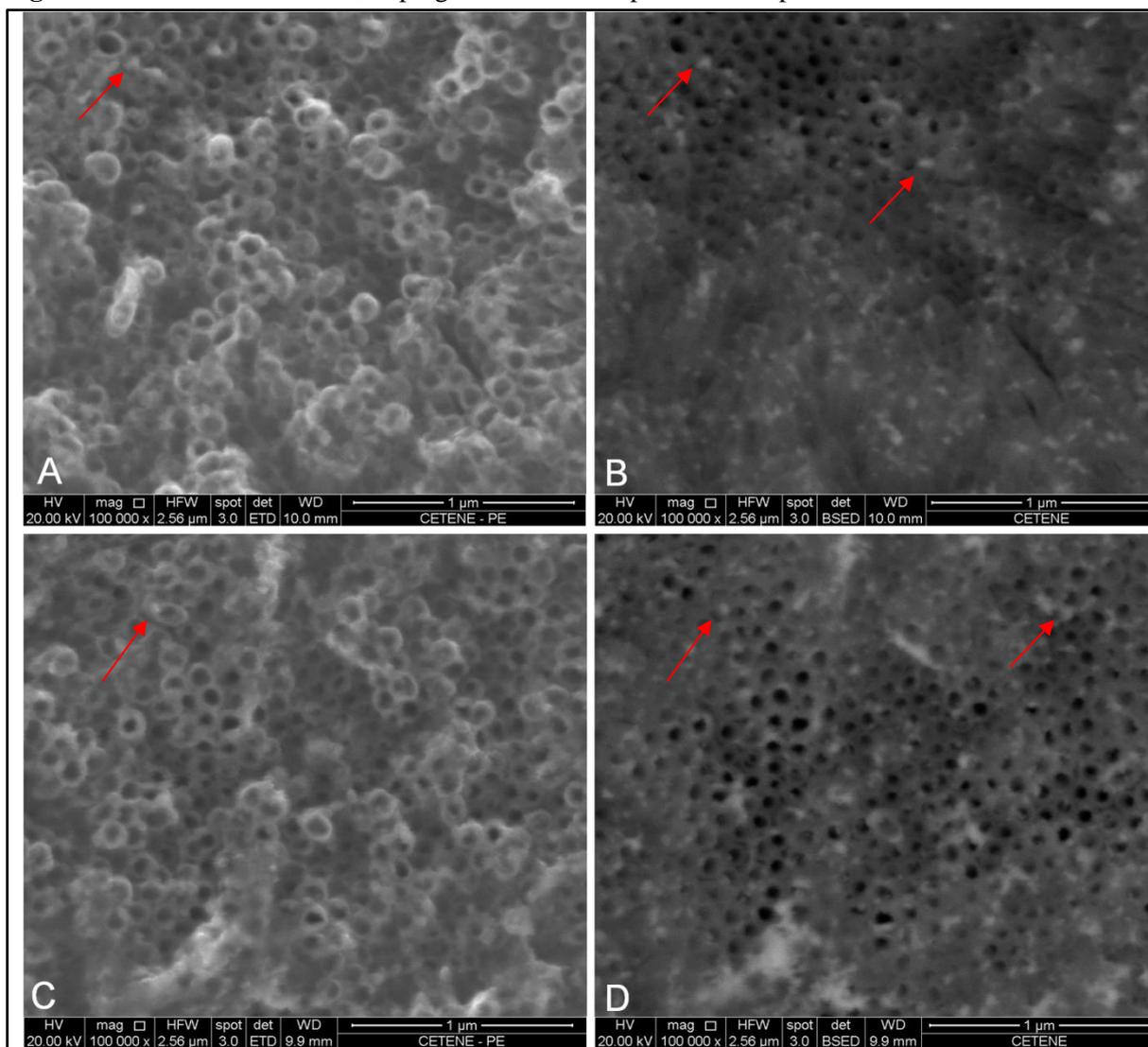
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: **A** – Nanotubos de TiO₂ com deposição de 12 camadas de PAA/PAH, Barra: 1 µm; **B** – Nanotubos de TiO₂ com deposição de 10 camadas de PAA/PAH, Barra: 1 µm; **C** – Nanotubos de TiO₂ com deposição de 8 camadas de PAA/PAH, Barra: 2 µm; **D** – Nanotubos de TiO₂ com deposição de 8 camadas de PAA/PAH, Barra: 1 µm.

Dessa forma, foi estabelecido que as amostras com 8 camadas seriam utilizadas como padrão para os demais testes de caracterização e ensaios biológicos. Após o processo de LbL, as amostras foram impregnadas por Ag e expostas por períodos de 12 e 24 horas na luz UV para avaliar a formação de diferentes perfis de nanopartículas. As análises por MEV mostraram que as nanopartículas de Ag foram impregnadas e distribuídas na superfície dos nanotubos de TiO₂ (**Figura 14A e 14C**). As imagens obtidas por elétrons retroespalhados (RE) nos permitem uma melhor visualização do tamanho e da distribuição dessas

nanopartículas (**Figura 14B e 14D**). As partículas podem ser vistas principalmente ao redor dos nanotubos, deixando seu lúmen livre para uma adequada interação com os osteoblastos.

Figura 14 – Nanotubos de TiO₂ impregnados com nanopartículas de prata

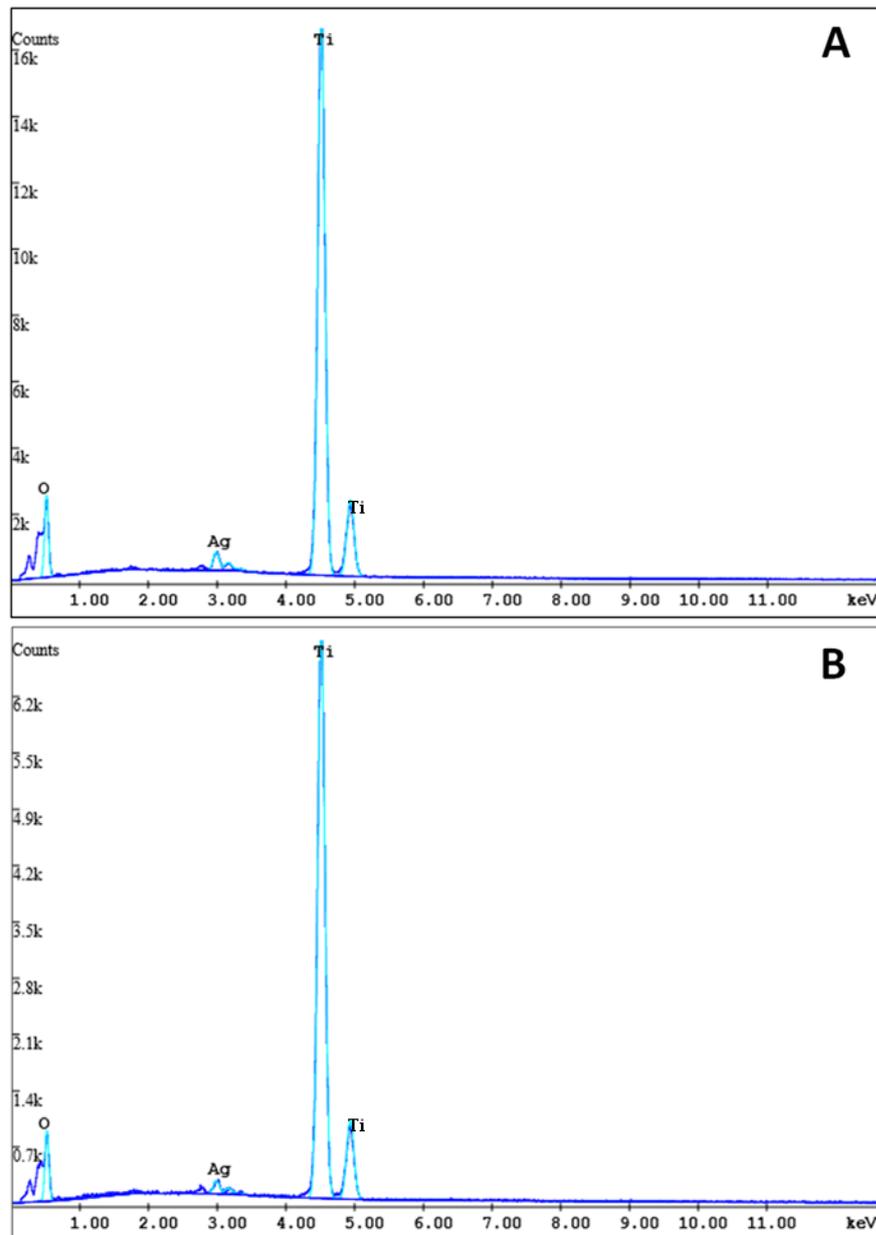


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: **A** – Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag e reduzidos 12h por luz UV, Barra: 1 µm; **B** – Imagem de elétrons retroespalhados (RE) correspondente à imagem A, Barra: 1 µm; **C** – Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag e reduzidos 24h por luz UV, Barra: 1 µm; **D** – Imagem de RE correspondente à imagem 5C. As setas destacam as nanopartículas.

As análises de EDS realizadas nas amostras impregnadas por Ag identificam o pico correspondente a este elemento, confirmando sua incorporação à superfície da amostra (**Figura 15**).

Figura 15 – Espectros de EDS para nanotubos de TiO_2 impregnados com nanopartículas de prata



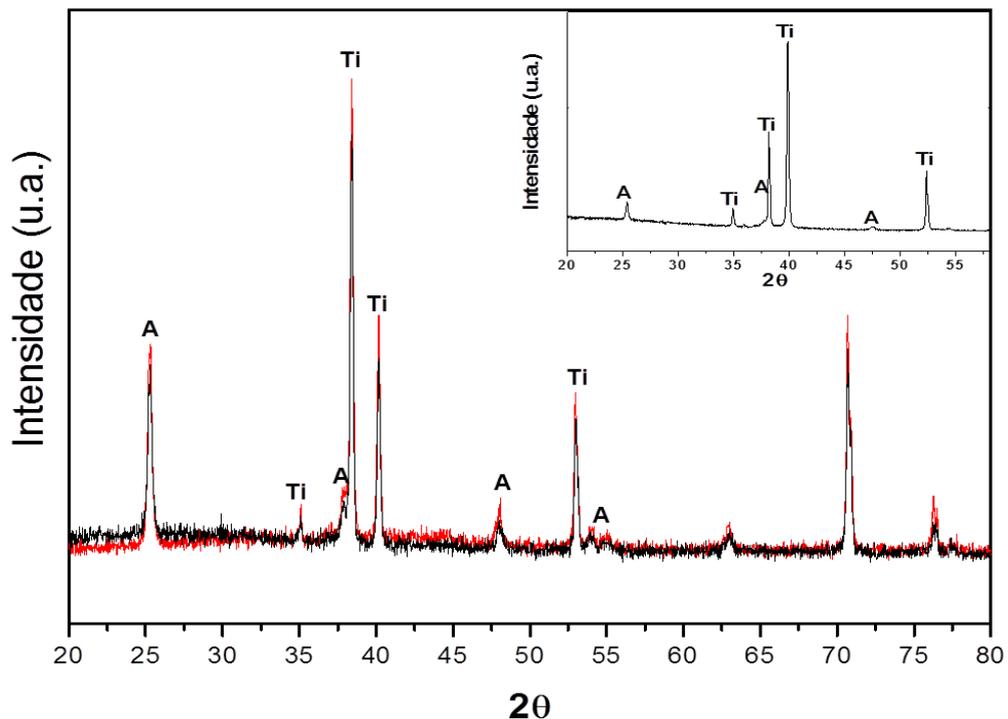
Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: **A** – Nanotubos de TiO_2 impregnados com Ag e reduzidos 12h por luz UV; **B** – Nanotubos de TiO_2 impregnados com Ag e reduzidos 24h por luz UV.

Com o intuito de identificar a fase anatase dos nanotubos de TiO_2 e elucidar o tipo de Ag presente, as amostras foram analisadas por DRX. A **figura 16** mostra o difratograma obtido da análise dos nanotubos impregnados com Ag. As reflexões de Bragg características para Ag(0) foram identificadas em $2\theta = 38$ e 78 de acordo com a ficha nº 2-1098 do *software* Search-Match. As demais reflexões são referentes à fase anatase do TiO_2 e do Ti, como identificados na figura pelas fichas 21-1272 e 44-1294, respectivamente. Os resultados obtidos nesta análise, caracterizam o perfil de Ag sobre as amostras como sendo Ag(0). Ou

seja, toda a prata presente na amostra foi reduzida, não havendo a presença de óxidos e consequentemente de Ag em sua forma iônica. As amostras reduzidas por 12 e 24 horas, apresentaram o mesmo perfil em seus difratogramas (dado não mostrado). Em acréscimo à caracterização dos componentes químicos da amostra, também é essencial identificar a estrutura do cristal (anatase, amorfo, rutilo, brokita ou suas fases combinadas). Nossas análises por DRX nos permitiram comprovar a presença de titânio na forma anatase.

Figura 16 – Difratograma para nanotubos de TiO₂ impregnados com nanopartículas de prata



Fonte: Elaborado pela autora

Adicionalmente, as amostras passaram por um processo de decomposição e tiveram a Ag quantificada por ICP-MS. Os resultados obtidos, exibidos na tabela 2, permitem saber a quantidade real de Ag (em μg) presente na amostra após os processos de incorporação e redução por UV.

Os resultados mostraram que não houve nenhuma diferença significativa, na quantidade de prata, entre as amostras que foram reduzidas por 12 e 24 horas em luz UV. Cada amostra possui em média cerca de $15\mu\text{g}$ de Ag distribuída em sua superfície de 1 cm^2 .

Tabela 1 – Resultados para determinação de Ag por ICP-MS em amostras de NT de TiO₂

Amostra	Ag, $\mu\text{g cm}^{-2}$	
	Concentração	DP
Nanotubos de TiO ₂	<0,1*	-
Nanotubos de TiO ₂ + PAA/PAH (<i>LbL</i>)	<0,1*	-
Nanotubos de TiO ₂ impregnados com Ag e reduzidos 12h por luz UV	15,35	0,6
Nanotubos de TiO ₂ impregnados com Ag e reduzidos 24h por luz UV	15,55	1,6

Fonte: Elaborado pela autora

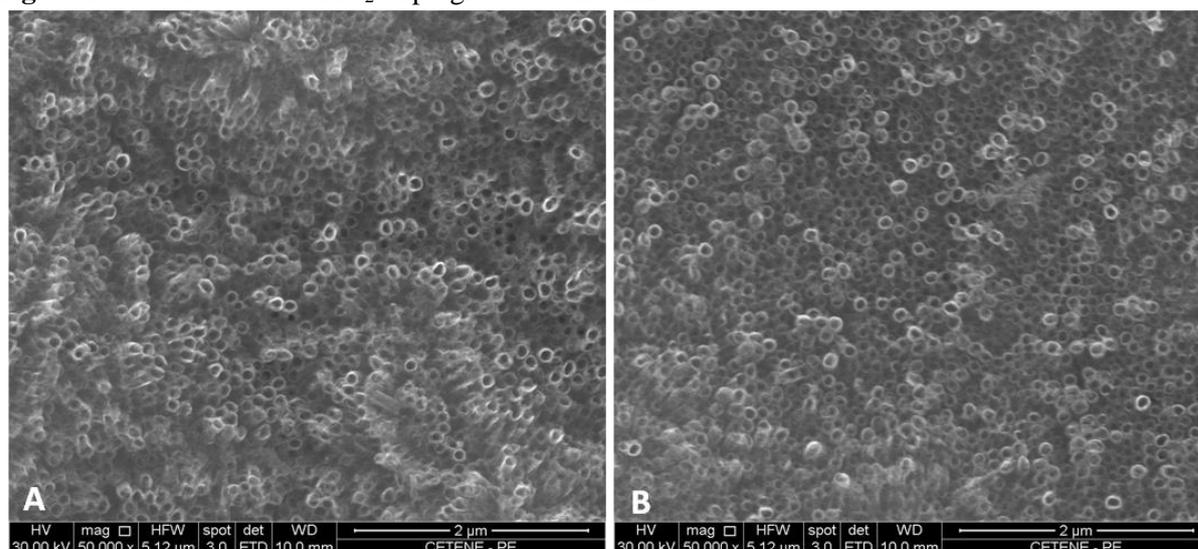
Legenda: Os resultados representam a concentração e o desvio padrão das medidas; DP = desvio padrão; (*) Limite de quantificação.

5.1.2 Nanotubos de TiO₂ impregnados com OniL

Em paralelo às amostras incorporadas com Ag, foi realizada também uma nova linha de investigação que consistiu no revestimento dos nanotubos de TiO₂ com compostos naturais com intuito de tentar aumentar a biocompatibilidade e promover uma atividade bactericida. Para isso foi utilizada a OniL, lectina purificada do soro do peixe Tilápia (*Oreochomis niloticus*), nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Previamente, os nanotubos de TiO₂ foram negativados com uma solução etanólica de NaOH para que pudessem apresentar uma maior capacidade de ligação à lectina, que possui sua atividade em pH 8,0 e exibe carga positiva. A OniL foi depositada sobre as amostras através do método de *spin coating*. O protocolo estabelecido consistiu no espalhamento de 50 μL da solução de lectina a 500 rpm por 3 minutos seguidos do gotejamento de mais 50 μL da lectina sob uma aceleração de 60 rpm/segundo e patamar final de 2000 rpm por 3 minutos.

As imagens obtidas por MEV mostram que não houve nenhuma modificação visual e nem no diâmetro das amostras impregnadas com as diferentes concentrações da lectina, com Esses dados sugerem a formação de um filme ultrafino sobre a superfície dos nanotubos, preservando assim as características de interesse, para a adesão das células (**Figura 17**).

Figura 17 – Nanotubos de TiO₂ impregnados com OniL



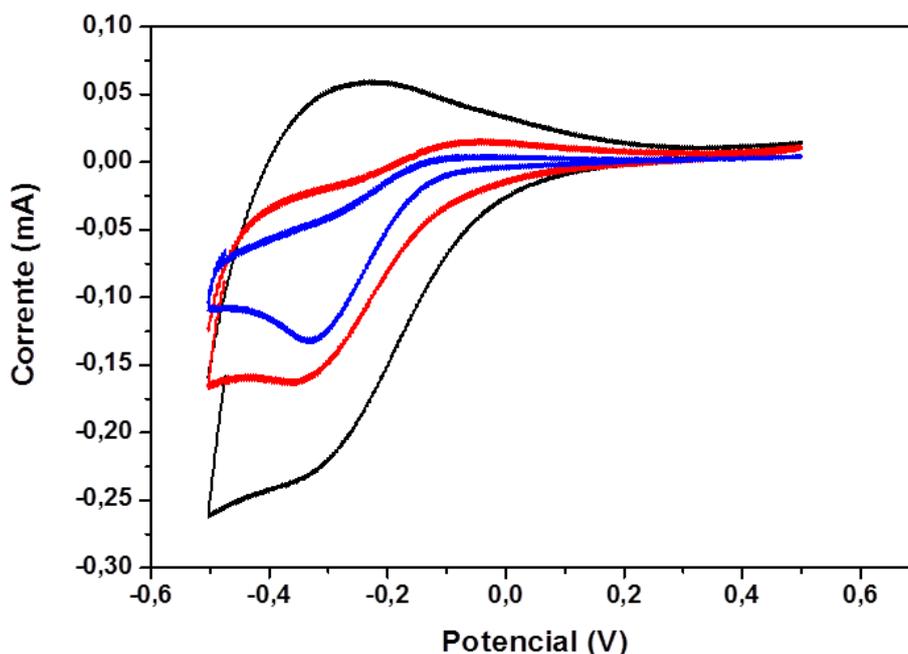
Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: **A** – Nanotubos de TiO₂ impregnados com uma solução de OniL a 100 µg/mL;

B – Nanotubos de TiO₂ impregnados com uma solução de OniL a 200 µg/mL. Barras: 2 µm.

Para averiguarmos a eficiência da deposição da OniL sobre os NT-TiO₂ utilizamos a Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIE). De acordo com a Figura 18, o voltamograma registrado para o eletrodo NT-TiO₂ apresentou irreversibilidade com um pico de redução em -0,3 V. Foi observado também pelo voltamograma do eletrodo NT-TiO₂ que o mesmo teve uma eletroatividade muito baixa no potencial acima de + 0,1 V com ausência de picos em uma região estreita. Logo, o pico de corrente analisado neste trabalho foi em -0,3V. Ainda na figura 18, verificou-se um decréscimo de corrente catódica em -0,3V no voltamograma do NT-Neg devido a incubação dos NT-TiO₂ à solução de NaOH, pH 13. Após a incubação com a lectina, observou-se o mesmo comportamento de diminuição da corrente catódica, podendo ser fortemente explicado pela interação da lectina aos NT-Neg.

Figura 18 – Voltamograma do eletrodo com Nanotubos de TiO_2

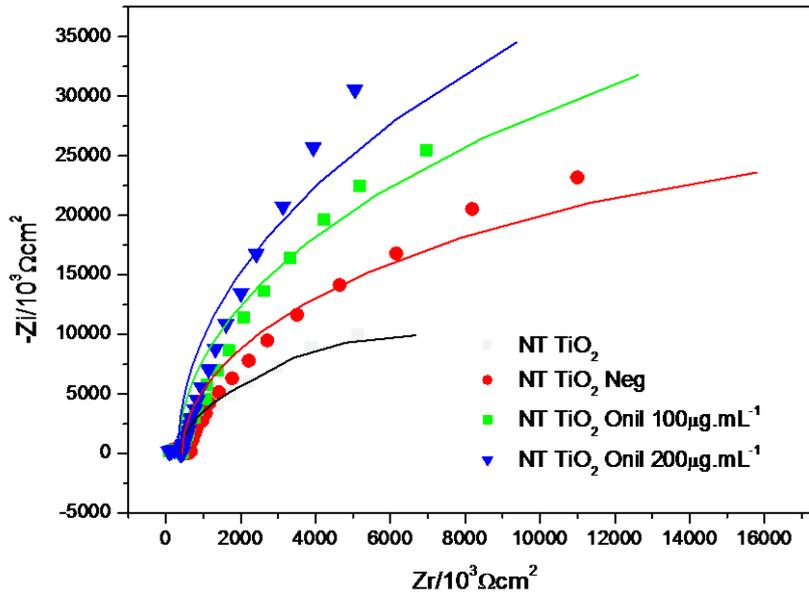


Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: (■) Voltamograma do eletrodo com NT- TiO_2 ; (■) NT-Neg; (■) NT-Onil (100 $\mu\text{g/mL}$) em solução de 10mM de Ferri/Ferro x Ag/ AgCl, $v=100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

De acordo com as medidas de impedância, a presença da lectina OniL sobre os NT-Neg foi analisada por mudança na resistência do gráfico de Nyquist (**Figura 19**). Podemos observar mudanças simultâneas nas componentes real (Z') e imaginária ($-Z''$) da impedância em toda a faixa de frequência para as três amostras. Esses resultados corroboram os dados de VC mostrados acima, cujas modificações na superfície eletródica causaram uma perturbação na transferência de elétrons, indicando a adsorção da lectina sobre os NT-Neg e, conseqüentemente, aumento da resistência e diminuição da capacitância. A adsorção da lectina OniL na superfície eletródica está associada ao bloqueio que a mesma provoca alterando a reação de transferência de elétrons da solução do par redox ferri/ferro.

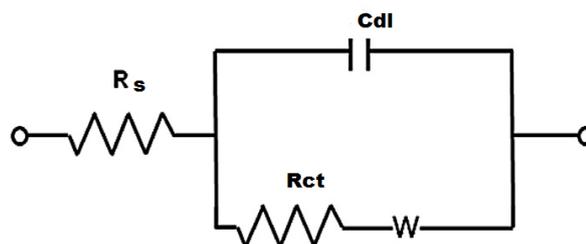
Figura 19 – Gráfico de Nyquist do eletrodo com as diferentes amostras em solução de 10mM de Ferri/Ferro x Ag/ AgCl.



Fonte: Elabora pela autora

As medidas de EIE foram analisadas através de um modelo de circuito elétrico equivalente de Randles (**Figura 20**) para auxiliar a interpretação dos gráficos de Nyquist. O circuito foi obtido com a modelagem dos resultados experimentais e os valores da resistência, capacitância e parâmetros cinéticos que esclarecem a natureza das modificações no eletrodo foram extraídos pelo *software* NOVA 1.11.

Figura 20 – Modelo do circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos na EIE.



Fonte: Elabora pela autora

A resistência da solução (R_s) e Impedância de Warburg (W) representam as propriedades eletrolíticas da solução e o processo de difusão da sonda ferri/ferro, respectivamente. Os outros dois componentes do circuito, C_{dl} (capacitância da dupla camada) e resistência de transferência de carga (R_{CT}), dependem das características dielétricas e isolantes na interface eletrodo-solução. A C_{dl} é fortemente influenciada por espécies que adsorvem na interface eletrodo/solução, por isso pode ser utilizada para monitorar a adsorção

de proteínas (GHEORHE; GUISEPPI-ELIE, 2003). Os valores de montagem dos elementos do circuito equivalente encontram-se na **Tabela 3**. De acordo com a tabela os valores de Cdl diminuem e os da RCT aumentam simultaneamente para os NT-Tio2, NT-Neg e NT-OniL, dificultando a transferência de carga.

Tabela 2 – Valores ajustados dos parâmetros obtidos do circuito equivalente para NT-TiO₂, NT-Neg e NT-OniL em 10mM de solução de ferri/ferro.

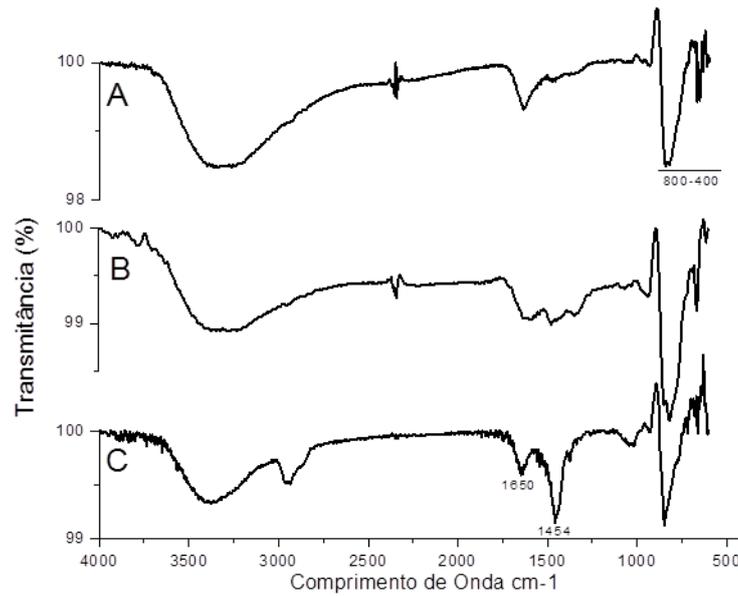
Modificações Eletródicas	Cdl (µF)*	Rct (kΩ)*
NT-TiO ₂	38,892	1,712
NT-Neg	35,33	3,291
NT-OniL	6,89	24,199

Fonte: Elabora pela autora

Legenda: (*) Valores extraídos dos parâmetros do Circuito Equivalente da EIE.

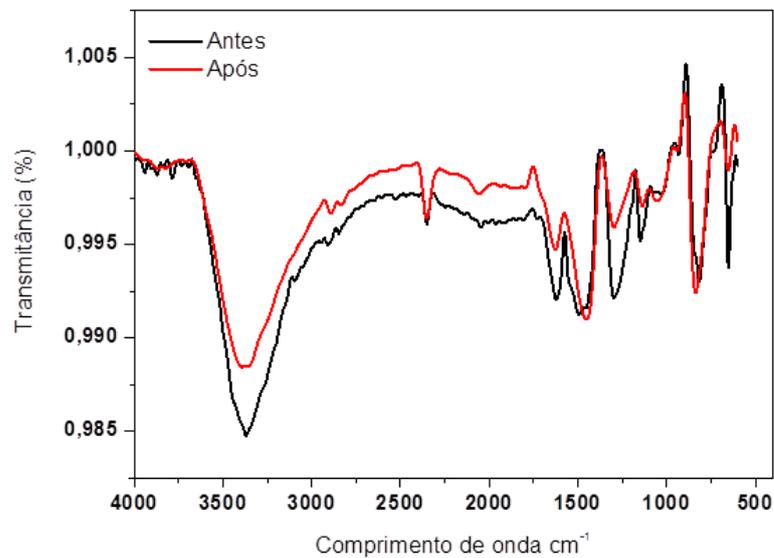
As técnicas de VC e EIE foram capazes de detectar a presença da Lectina OniL sobre os nanotubos com aumento significativo na resistência de transferência de elétrons por estar associada ao bloqueio que a mesma provocou alterando a reação de transferência de elétrons da solução de ferri-ferro.

Com o objetivo de confirmar a presença da lectina OniL nos nanotubos de TiO₂, as amostras também foram analisadas por FTIR com cristal de ATR. A vibração Ti-O ocorre na região de 400-800 cm⁻¹ (WAN, 2012) dados que estão de acordo com as bandas características observadas nesta região nos espectros das amostras. Há evidências claras que a lectina OniL está na superfície do substrato de NT-TiO₂-Neg (**Figura 21**). Isso pode ser comprovado com o aparecimento dos dois principais estiramentos referentes aos grupamentos de amidas da lectina em 1643 cm⁻¹ (WANG, 2012) /1025cm⁻¹ e 1456 cm⁻¹/1010 cm⁻¹ (LEWIS et al., 2013). Na figura 22, observa-se a presença dessas bandas, mesmo após duas lavagens em tampão, indicando que a lectina OniL foi eficientemente adsorvida na superfície dos nanotubos de TiO₂.

Figura 21 – Espectroscopia no Infravermelho

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (A) NT-TiO₂; (B) NT-Neg; (C) NT-OniL.

Figura 22 – Espectroscopia no Infravermelho com cristal de ATR da amostra NT-Onil antes e após lavagem.

Fonte: Elaborado pela autora

5.2 Avaliação da Biocompatibilidade

Para os testes de biocompatibilidade foram utilizados 7 tipos de amostra: **(1)** Nanotubos de TiO₂ (NT), utilizados como grupo controle; **(2)** Nanotubos de TiO₂ com deposição das 8 camadas de polímeros por LbL; **(3)** Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag e reduzidos 12h por luz UV (Ag-UV12); **(4)** Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag e

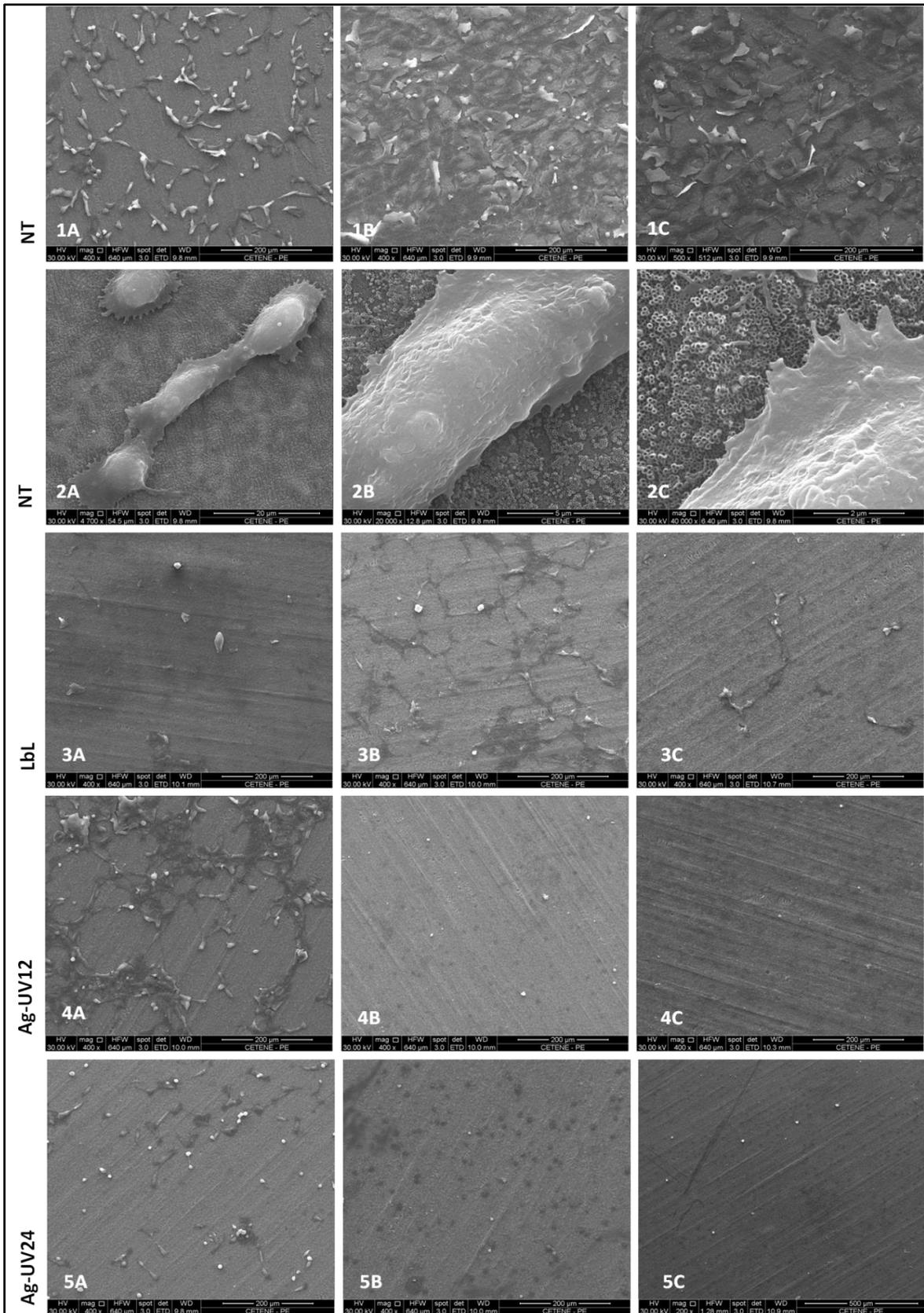
reduzidos 24h por luz UV (Ag-UV24); **(5)** Nanotubos de TiO₂ negativados (NT-Neg); **(6)** Nanotubos de TiO₂ impregnados com OniL a 100µg/mL (OniL100); e **(7)** Nanotubos de TiO₂ impregnados com OniL a 200µg/mL (OniL200). Para uma melhor compreensão, os resultados alcançados foram exibidos dividindo as amostras em dois grupos: Grupo Ag (1,2,3 e 4) e Grupo OniL (1,5,6 e 7).

5.2.1 Avaliação Morfológica

A fim de avaliar a capacidade de adesão e morfologia das células frente às amostras, os osteoblastos humanos (HOS) foram levados à interagir por 24, 48 e 72 horas com os diferentes grupos de amostra. Através das imagens obtidas por MEV, observou-se que as células foram capazes de aderir de forma homogênea e de manter sua morfologia alongada e bem preservada ao longo da superfície dos NTs. Em baixo aumento, pode-se notar a distribuição uniforme das células na superfície da amostra, além da proliferação celular evidenciada através do aumento do número de células nos diferentes períodos de incubação (**Figura 23.1A–1C**). A visualização destas células em grandes aumentos evidenciou a formação de projeções celulares e lamelopódios em direção a matriz nanotubular, dados que corroboram a boa biocompatibilidade deste material (**Figura 23.2A–2C**). Nos tempos maiores de cultivo das células sobre a matriz de NTs, observa-se a deposição de material amorfo extracelular de aspecto lamelar, e um maior espalhamento das células, compatíveis com o processo de osteogênese.

As amostras LbL, Ag-UV12 e Ag-UV24 não foram capazes de promover uma boa biocompatibilidade, provocando uma diminuição significativa do número de células aderidas à sua superfície após 24 horas de incubação (**Figura 23.3A–3C, 4A–4C, 5A–5C**). Desta forma, os outros parâmetros como potencial osteogênico não puderam ser analisados para essas amostras. Interessantemente nas células cultivadas em Ag-UV12 ocorre a deposição precoce de material amorfo.

Figura 23 – Avaliação morfológica de osteoblastos cultivados sobre diferentes amostras – Grupo Ag



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (1A–1C) Osteoblastos cultivados sobre NT por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente. Barras: 200 µm; (2A–2C) Detalhes morfológicos de osteoblasto cultivado sobre NT por período de 24h, respectivamente. Barras: 20, 5 e 2 µm, respectivamente; (3A–3C) Osteoblastos cultivados sobre LbL por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente. Barras: 200 µm; (4A–4C) Osteoblastos cultivados sobre Ag-UV12 por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente. Barras: 200 µm; (5A–5C) Osteoblastos cultivados sobre Ag-UV24 por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente. Barras: 200 µm.

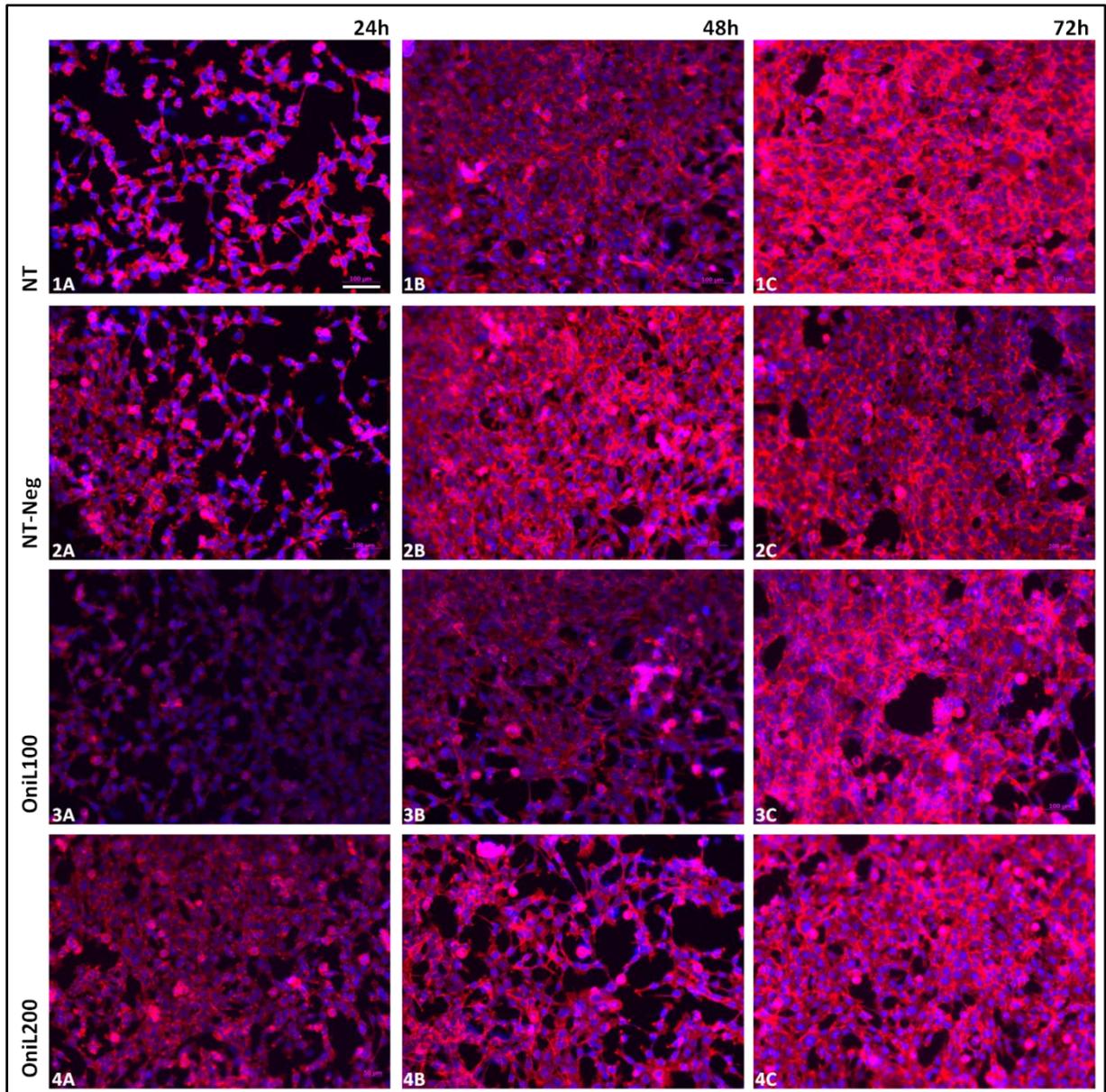
5.2.2 Avaliação da Adesão Celular

Para avaliar melhor a adesão dos osteoblastos sobre as diferentes amostras, os filamentos de actina do citoesqueleto foram marcados com rodamina-faloidina que emite fluorescência no comprimento de onda correspondente ao vermelho, e os núcleos marcados com DAPI que emite fluorescência na faixa correspondente ao azul. Após 24, 48 e 72 horas do plaqueamento, o espalhamento das células, morfologia e densidade celular foram avaliados através de microscópio de fluorescência.

Nas amostras de nanotubos de TiO_2 (NT) as células apresentaram morfologia bem preservada, citoplasma espreado, filamentos bem estruturados e adesão entre as células vizinhas, além do forte adesão ao substrato, característico desta linhagem celular em cultura. Além disso, a partir de 48 horas de incubação, pode-se notar um significativo aumento no número de células levando à formação de uma camada celular confluenta sobre a superfície das amostras (**Figura 24.1A-1C**). Estas mesmas características também puderam ser observadas nas amostras do Grupo OniL, que foram capazes de induzir a adesão e proliferação celular sugerindo a boa biocompatibilidade desses materiais (**Figura 24.2A-C, 3A-3C, 4A-4C**).

Em contraste, as amostras do Grupo Ag apresentaram uma baixa densidade celular quando comparadas ao controle. As poucas células aderidas sobre as superfícies contendo LbL e Ag formavam pequenos grupos isolados, estabelecendo pouco ou nenhum contato com as células vizinhas. Há um decréscimo evidente nos grupos LbL e Ag da intensidade de fluorescência correspondente a marcação actina. Filamentos curtos e desorganizados puderam ser observados apenas na região perinuclear, o que não condiz com a distribuição esperada para este elemento do citoesqueleto. Mesmo as amostras que interagiram por períodos mais longos de tempo, 48 e 72 horas, não foram capazes de induzir à proliferação celular (**Figura 25**).

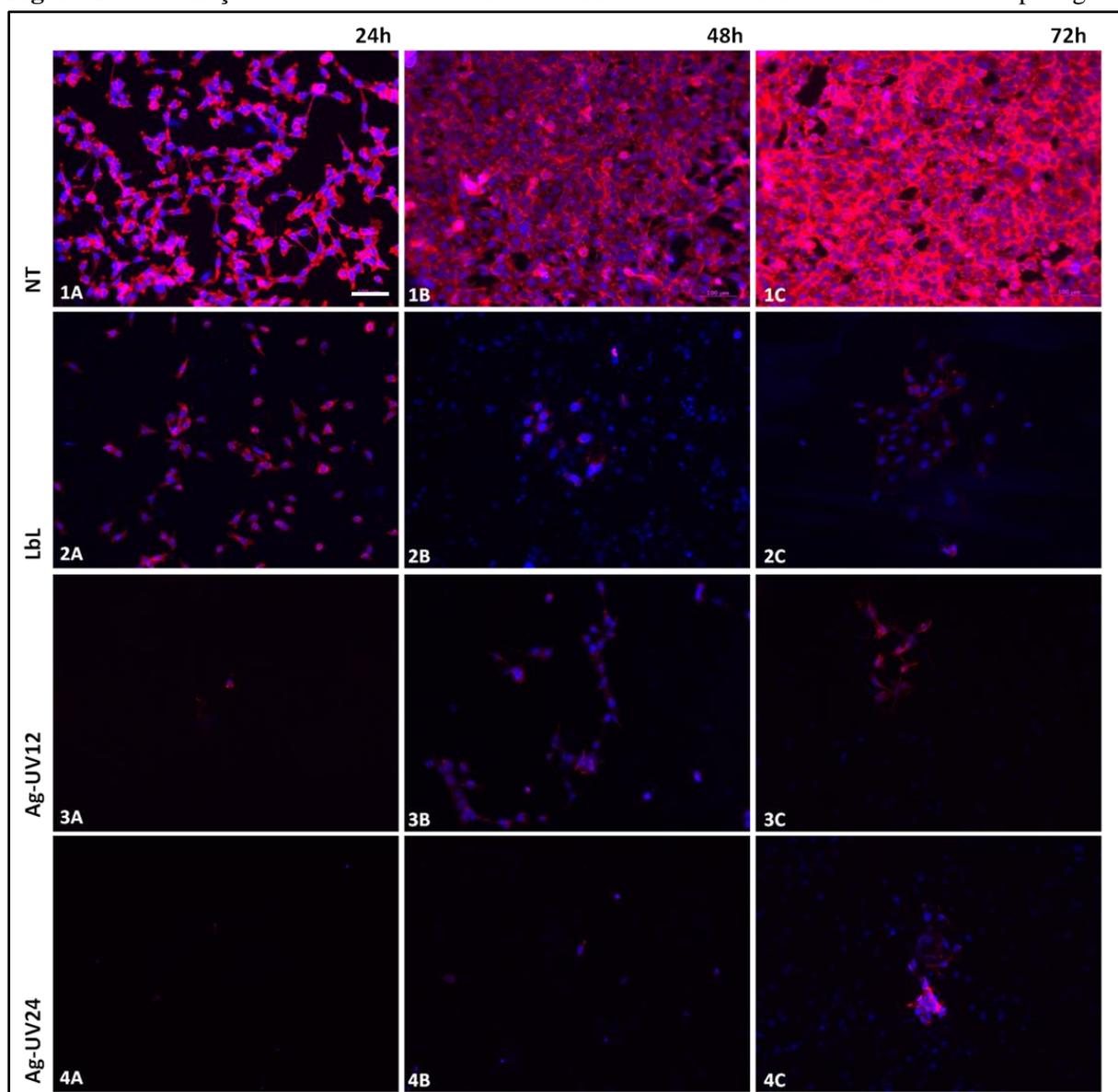
Figura 24 – Avaliação da Adesão de osteoblastos cultivados sobre diferentes amostras – Grupo OniL



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Imagens de fluorescência mostram os filamentos de actina (vermelho) e núcleo (azul).
 (1A – 1C) Osteoblastos cultivados sobre NT por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente.
 (2A – 2C) Osteoblastos cultivados sobre NT-Neg por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente.
 (3A – 3C) Osteoblastos cultivados sobre OniL100 por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente;
 (4A – 4C) Osteoblastos cultivados sobre OniL200 por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente.
 Aumento de 100x. Barra – 100µm.

Figura 25 – Avaliação da Adesão de osteoblastos cultivados sobre diferentes amostras – Grupo Ag



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Imagens de fluorescência mostram os filamentos de actina (vermelho) e núcleo (azul).

(1A – 1C) Osteoblastos cultivados sobre NT por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente.

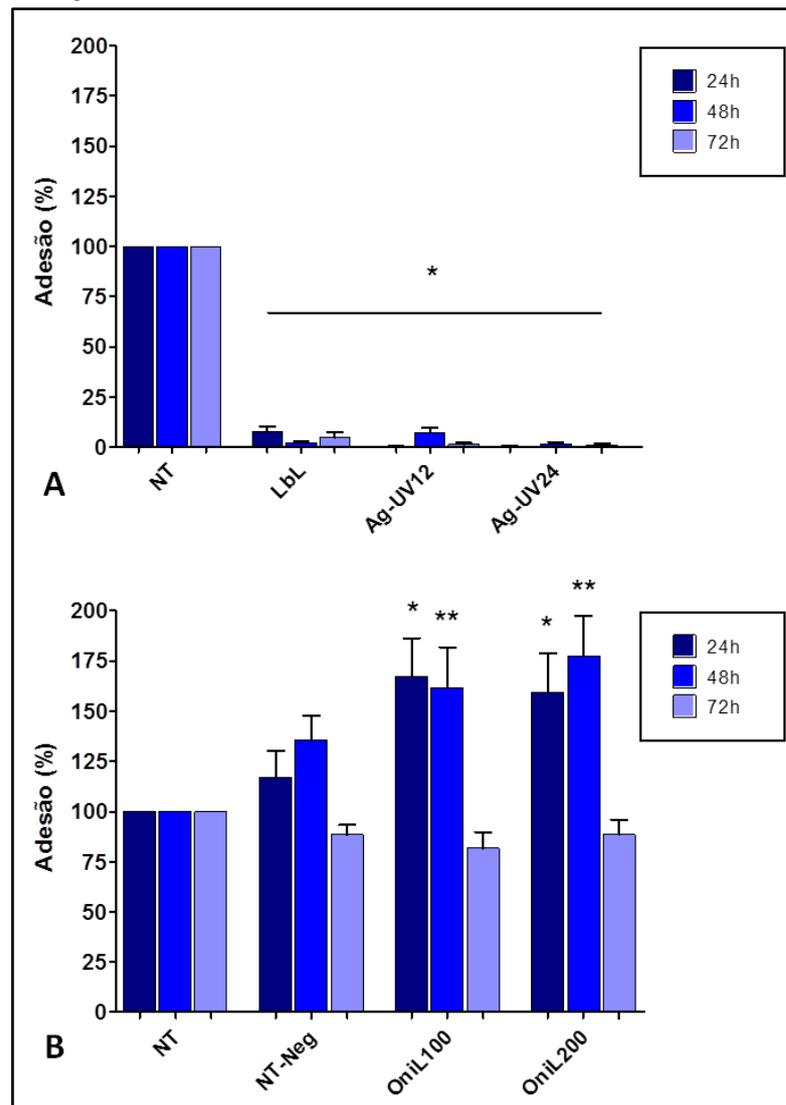
(2A – 2C) Osteoblastos cultivados sobre LbL por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente.

(3A – 3C) Osteoblastos cultivados sobre Ag-UV12 por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente;

(4A – 4C) Osteoblastos cultivados sobre Ag-UV24 por períodos de 24,48 e 72h, respectivamente.

Aumento de 100x. Barra – 100 μ m.

Com as imagens obtidas por microscopia de fluorescência, foi feita a quantificação do número de células aderidas sobre cada amostra, como indicativo indireto da proliferação celular. A média obtida de cada contagem foi comparada à média do grupo controle. Os resultados, expressos em porcentagem, estão apresentados no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Quantificação da adesão de osteoblastos sobre as diferentes amostras

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: **A** – Adesão de osteoblastos sobre amostras do Grupo Ag. **B** – Adesão de osteoblastos sobre amostras do Grupo OniL. (*) Os valores foram significativos quando comparados com NT 24h onde $*p < 0,001$; (**) comparados com NT 48h onde $**p < 0,0005$. Teste ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Os dados obtidos mostraram uma drástica e significativa redução do número de células aderidas nas amostras do Grupo Ag quando comparadas ao controle, corroborando as imagens obtidas por MEV. A máxima adesão celular deste grupo ocorreu na amostra LbL com 24 horas de incubação, no entanto, nota-se que não houve proliferação destas células ocorrendo inclusive uma diminuição da adesão celular nos períodos seguintes de 48 e 72 horas. As amostras contendo Ag mostraram uma quantidade ainda menor de células em sua superfície não ultrapassando o valor de 1% de adesão na maioria das situações (**Gráfico 1A**).

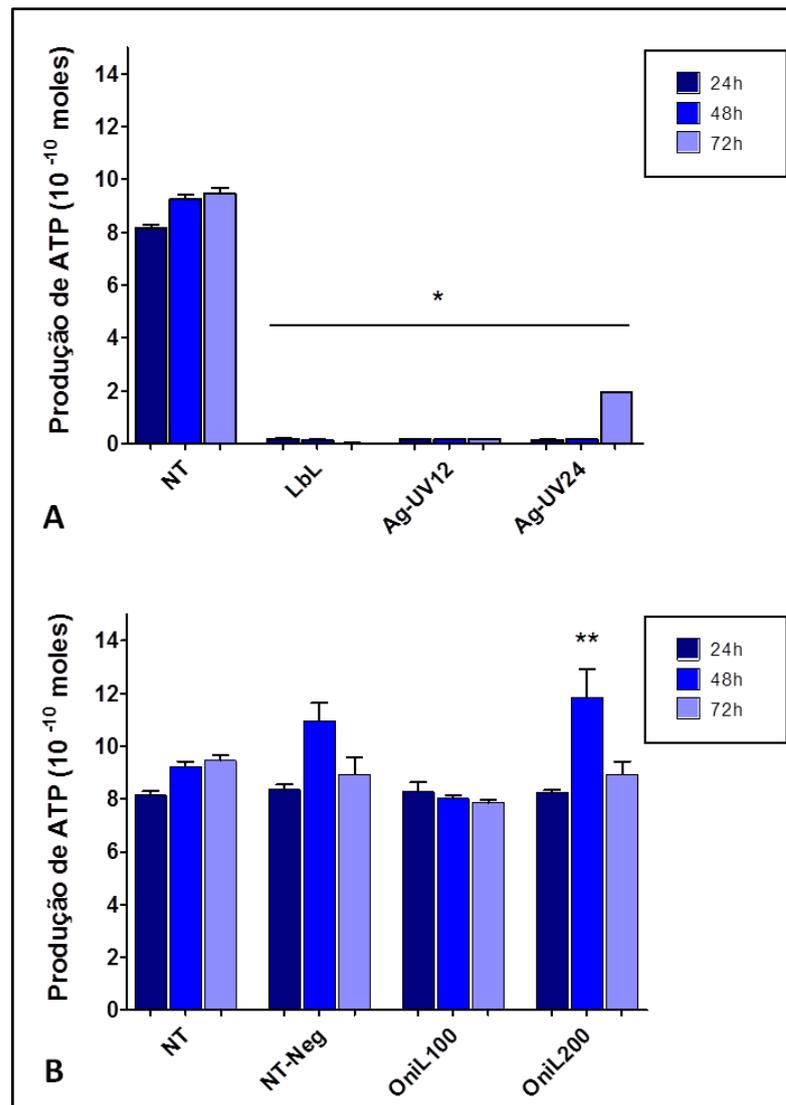
Nas amostras do Grupo OniL, os NT-Neg apresentaram um aumento na porcentagem de células aderidas durante as primeiras 48 horas de incubação. Já OniL100 e OniL200 foram capazes de aumentar significativamente a porcentagem de células aderidas na superfície dos NTs nos períodos de 24 e 48 horas, indicando um aumento na proliferação celular. Nestas condições, observou-se que o número de células aderidas foi 50% maior em comparação aos respectivos controles (NTs e NTs-Neg). Após 72 horas de incubação, não houve alteração significativa em nenhuma das superfícies (**Gráfico 1B**). Os resultados obtidos neste grupo evidenciam a uma intensa proliferação e adesão celular nas amostras revestidas com a lectina OniL, sugerindo a melhora na biocompatibilidade destes materiais após o tratamento com a lectina principalmente nos tempos iniciais de cultivo.

5.2.3 Avaliação da Viabilidade Celular

A viabilidade das células cultivadas sobre as amostras foi avaliada pela quantificação de ATP. A produção do ATP foi reduzida significativamente em todas as amostras do grupo Ag, nos três tempos de incubação (**Gráfico 2A**). Este perfil já era esperado, uma vez que nenhuma destas amostras foi capaz de promover a adesão celular em sua superfície. Essa baixíssima produção de ATP indica que as amostras LbL, Ag-UV12 e Ag-UV24 podem tanto apresentar citotoxicidade para as células em estudo quanto também inibir a adesão das células ao substrato, demonstrando a baixa biocompatibilidade deste grupo.

No grupo OniL, um aumento significativo do ATP foi observado somente em OniL200 com 48 horas de incubação, indicando uma intensa atividade metabólica dos osteoblastos nestas condições. Vale salientar que esta amostra também foi a que apresentou o maior número de células aderidas. As demais amostras foram capazes de manter o mesmo nível de produção de ATP que o controle, sem apresentar nenhuma toxicidade para os osteoblastos (**Gráfico 2B**). Sendo assim, neste teste, o grupo OniL se mostrou capaz de manter a viabilidade e proliferação das células cultivadas em sua superfície.

Gráfico 2 – Viabilidade celular de osteoblastos sobre as diferentes amostras



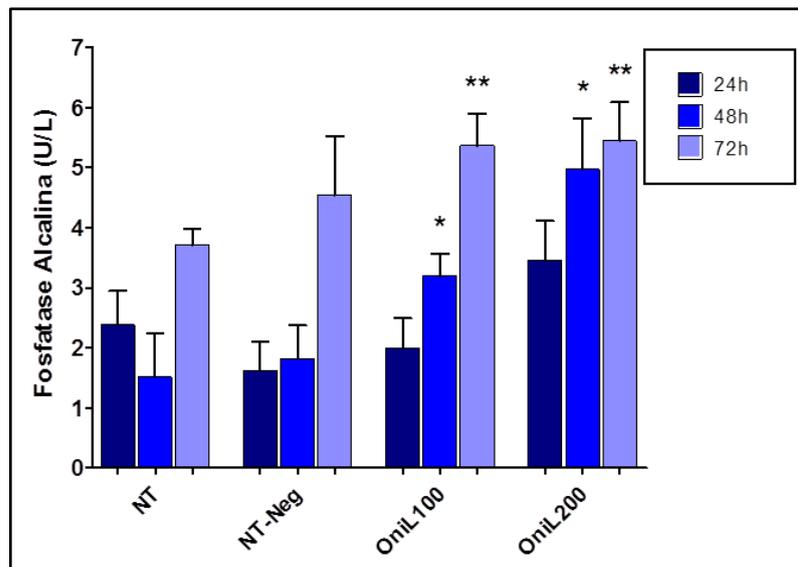
Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: **A** – Produção de ATP por osteoblastos cultivados sobre amostras do Grupo Ag. **B** – Produção de ATP por osteoblastos cultivados sobre amostras do Grupo OniL. (*) Os valores foram significativos quando comparados com o NT nos tempos de 24, 48 e 72h onde $*p < 0,0001$, teste ANOVA com pós teste de Bonferroni; (**) significativo em comparação com NT 48h onde $**p < 0,002$, teste *t*-Student..

5.2.4 Avaliação do potencial osteogênico

A fim de avaliar a capacidade das amostras do grupo OniL em induzir a formação óssea, foi feita a dosagem da atividade da fosfatase alcalina, enzima que é produzida pelos osteoblastos durante a produção de matriz óssea.

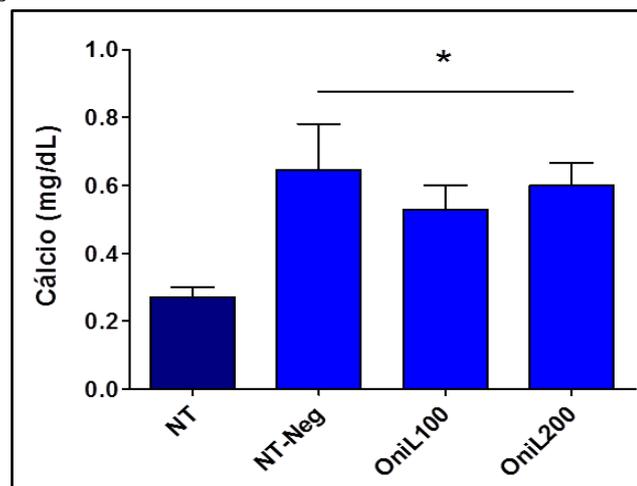
Os dados resultantes mostram um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina nas amostras revestidas por OniL nos períodos de 48 e 72 horas de incubação (**Gráfico 3**).

Gráfico 3 – Atividade da fosfatase alcalina em células cultivadas sobre as diferentes amostras

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos cultivados sobre amostras do grupo OniL. Resultado expressos em U/L, que corresponde à quantidade de enzima que liberam por hidrólise, 1 μ M de timolftaleína por minuto, por litro de solução. (*) Os valores foram significativos quando comparados com NT 48h onde $*p < 0,01$; (**) quando comparados com NT 72h onde $**p < 0,02$. Teste ANOVA com pós teste de Bonferroni.

O cálcio, um dos principais elementos envolvidos nos processos de remodelação e bioquímica do tecido ósseo, também foi quantificado após 72 horas. Todas as amostras do grupo OniL induziram a um aumento significativo da quantidade de cálcio intracelular em comparação com a amostra controle (NT- TiO₂) (**Gráfico 4**).

Gráfico 4 – Quantificação do cálcio em células cultivadas sobre as diferentes amostras

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Quantificação do cálcio em osteoblastos cultivados sobre amostras do grupo OniL. (*) Os valores foram significativos quando comparados com NT onde $*p < 0,03$ teste ANOVA com pós teste *t*-Student.

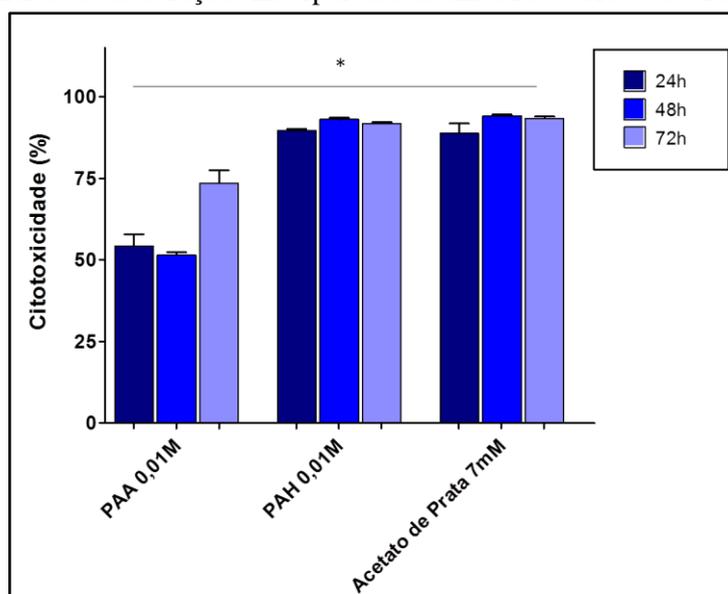
Estes resultados indicam que além de promover uma boa adesão das células e não apresentar toxicidade, as amostras revestidas com OniL são capazes de induzir a osteogênese. Em conjunto, os ensaios realizados *in vitro* com a linhagem de osteoblastos sugerem que o revestimento dos nanotubos de TiO₂ com a lectina OniL foi capaz de melhorar significativamente a biocompatibilidade deste material.

5.2.5 Avaliação da citotoxicidade das soluções incorporadas

A fim de investigar a causa da baixa biocompatibilidade das amostras do grupo Ag, nós avaliamos a citotoxicidade das soluções utilizadas na síntese dessas amostras. Foram avaliadas as soluções de 0,01M PAA (pH 3,5) e 0,01M PAH (pH 3,5) – polímeros utilizados para revestir a amostra por *LbL* – além da solução de acetato de prata 7mM – utilizada posteriormente para impregnação com Ag.

Todas as soluções testadas foram altamente tóxicas aos osteoblastos em todos os períodos de incubação. Os resultados, exibidos no Gráfico 5, mostram uma citotoxicidade acima de 50% em todas as análises. As soluções de acetato de prata e de PAH, foram as mais agressivas exibindo um grau de toxicidade acima de 90% nos períodos de 48 e 72 horas de cultivo.

Gráfico 5 – Citotoxicidade das soluções incorporadas às amostras sobre osteoblastos



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Efeito citotóxico dos polímeros PAA/PAH e do acetato de prata sobre osteoblastos.

(*) Os valores foram significativos quando comparados com o controle onde $*p < 0,03$ teste ANOVA com pós teste *t*-Student.

5.3 Atividade Antimicrobiana

A capacidade das amostras em evitar a formação de biofilme bacteriano sobre as suas superfícies foi avaliada. Para isso, as amostras foram incubadas frente a uma bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e uma Gram-negativa (*E.coli*). Os dados observados, exibidos na Tabela 4, foram expressos em número de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).

Todas as amostras apresentaram crescimento bacteriano em suas superfícies, incluindo as amostras revestidas com nanopartículas de Ag e com OniL. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as amostras controle (NT) e as demais amostras. Adicionalmente, as amostras foram testadas frente a uma linhagem de *C. albicans* onde foi possível notar uma discreta diminuição do número de colônias nas amostras Ag-UV12 e nas amostras revestidas com OniL, quando comparadas com o controle.

Tabela 3 – Crescimento de diferentes cepas microbiológicas sobre a superfície das amostras.

AMOSTRAS	UFC/mL		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
NT	1×10^6	$5,1 \times 10^4$	$8,1 \times 10^4$
LbL	$8,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^4$
Ag-UV12	$>10^7$	6×10^6	$1, \times 10^4$
Ag-UV24	$>10^7$	$6,4 \times 10^6$	$4,2 \times 10^4$
NT-Neg	$>10^7$	$>10^7$	$5,2 \times 10^6$
OniL100	$>10^7$	$3,8 \times 10^6$	2×10^4
OniL200	$>10^7$	$3,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: UFC= Unidade Formadora de Colônia; $>10^7$ equivalem a um crescimento incontável (tomou toda a placa).

6 DISCUSSÃO

Atualmente, muitas modificações na superfície de implantes de titânio e suas ligas estão sendo investigadas no intuito de melhorar as próteses utilizadas para aplicações biomédicas. Os implantes com topografia em escala nanométrica, especialmente os nanotubos de TiO_2 , têm recebido cada vez mais atenção. Estudos demonstram que os nanotubos de TiO_2 exibem excelente biocompatibilidade e diminuem as reações adversas (GONGADZE et al., 2011; OH et al., 2009; PARK et al., 2009; WANG et al., 2015).

Vários estudos reportam que a viabilidade, proliferação, migração e diferenciação das células-tronco mesenquimais e células-tronco hematopoiéticas, assim como o comportamento dos osteoblastos e osteoclastos são fortemente afetados pela escala nanométrica dos NTs de TiO_2 (LAN et al., 2013; WANG et al., 2015). Embora não exista um consenso sobre qual é o tamanho ideal, a literatura tem demonstrado que a biocompatibilidade é aumentada com NTs de TiO_2 na faixa de 15 nm, mas extremamente reduzida em diâmetros maiores de 100 nm, levando a células a entrarem em um processo de apoptose (KULKARNI et al., 2015, LAN et al., 2013). No presente estudo, foi demonstrado que NTs obtidos na faixa de 70 nm apresentaram uma excelente biocompatibilidade favorecendo tanto a adesão quanto a proliferação celular corroborando a utilização de diâmetros abaixo de 100 nm (BRAMMER et al., 2009).

O TiO_2 pode existir em 8 diferentes formas cristalográficas, sendo a anatase, o rutilo e a brokita as mais comuns. Após a anodização os nanotubos de TiO_2 passaram por um tratamento térmico a fim de modificar a sua estrutura para a forma anatase, que pôde ser confirmada pela análise por DRX. Esta forma cristalográfica foi selecionada para uso por se tratar de uma estrutura altamente organizada e que melhor favorece a nucleação da hidroxiapatita (parte inorgânica do osso), pois ocorre a epitaxia das duas estruturas cristalinas (SILVA et al. 2012; UCHIDA et al., 2003), favorecendo o processo de osseointegração. Além disso, estudos relatam que nanotubos com diâmetro entre 20 e 100 nm, bem como aqueles tratados termicamente para a fase anatase (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011), favorecem à molhabilidade, resultando em uma superfície hidrofílica, que é crucial para os processos de adsorção de proteínas, adesão e espreadimento celular (SHIN et al., 2011). De fato, nanotubos de TiO_2 utilizados neste estudo como controle mostraram uma excelente adesão e proliferação celular.

É consenso na literatura que o processo de anodização permite a formação de uma topografia submicroscópica durante a descarga elétrica. Durante este processo, grupos

funcionais hidrofílicos, tais como .OH, são gerados quando em contato com a água. Estudos têm demonstrado que os osteoblastos cultivados sobre a superfície de titânio obtidas pelo processo de anodização aumentam a expressão de genes osteogênicos e a extensão de áreas mineralizadas com melhora das propriedades mecânicas (YAMADA et al., 2015) Tem sido assumido que tal acréscimo nas propriedades do tecido mineralizado é uma função do -OH gerado devido a fase anatase. O .OH pode oxidar os resíduos de lisina do colágeno imaturo produzido pelos osteoblastos, permitindo que a matriz de suporte seja gerada através de ligações cruzadas entre essas proteínas. Yamada et al. (2015) analisaram a atividade de amostras de titânio oxidadas por anodização com ou sem a liberação de .OH. Estes autores confirmam que a liberação deste radical aumenta as propriedades nanomecânicas do tecido mineralizado, enquanto as alterações nas propriedades de superfície (hidrofilicidade e topografia) estão relacionadas com a expressão de genes osteogênicos pelas células.

A deposição dos polímeros PAA e PAH através do método *LbL*, por sucessivas rodadas de imersão, resultam em um substrato altamente adesivo, uniforme e estável (PATTABHI et al., 2014). As multicamadas de polímeros construídas exibem propriedades de superfície, tais como natureza química, topografia, módulo de elasticidade e biocompatibilidade que podem ser ajustadas de acordo com diferentes parâmetros como, composição dos polieletrólitos utilizados, número de camadas depositadas e o grau de ligação covalente entre as camadas (que aumenta a rigidez) (SCHLENOFF, 2012). No presente estudo, o número de camadas de PAA/PAH depositadas sobre o titânio foi ajustado a fim de se obter um filme fino suficiente para manter a topografia nanotubular da superfície do titânio e favorecer a incorporação das nanopartículas de Ag. Entretanto, todas as amostras contendo PAA/PAH exibiram um caráter altamente tóxico frente aos osteoblastos. Estes resultados foram evidenciados nas análises por MEV, por microscopia de fluorescência e através da quantificação da viabilidade celular nas amostras que continham apenas os filmes (LbL) depositados sobre os nanotubos de TiO₂, bem como nas amostras decoradas com Ag (Ag-UV12 e Ag-UV24).

Sabe-se que filmes construídos pela interação entre o polícatión PAH e o poliânion PAA são estáveis e descritos na literatura como citofílicos, favorecendo inclusive a diferenciação de células-tronco mesênquimais em osteoblastos (PATTABHI et al., 2014). Os resultados desfavoráveis obtidos no presente estudo são atribuídos ao baixo pH (3,5) utilizado. Este valor de pH foi selecionado por favorecer a montagem de filmes finos (SHIRATORI et al., 2000). Porém, a superfície de caráter ácido não foi capaz de promover a

adesão e proliferação celular. Este tipo de incompatibilidade também foi observado em estudos semelhantes realizados por Chien et al. (2010; 2011), no qual construções com os mesmos polímeros em pH 2,0 se mostraram tóxicos para osteoblastos e para componentes sanguíneos. Em baixo pH os grupos carboxílicos do PAA estão em sua maior parte na forma protonada, enquanto as amins do PAH estão completamente protonadas. Quando uma película de PAA/PAH é montada, mais de PAA é adsorvido para compensar o PAH totalmente carregado de modo que a composição de uma bicamada de PAA/PAH é não estequiométrica e enriquecida em PAA (aproximadamente 70% de PAA e de 30% de PAH em pH 2,0) (YOO et al., 1998; SHIRATORI; RUBNER, 2000). Os grupos carboxílicos excedentes se tornam completamente ionizados em pH fisiológico favorecendo a hidratação, que acaba gerando inchaço e baixa rigidez do filme (CHIEN et al., 2010). Os resultados dos ensaios de citotoxicidade por MTT, com as soluções de PAA e PAH isoladas, confirmaram a alta toxicidade dos polímeros em pH 3,5. Por outro lado, excelentes resultados de adesão, proliferação e diferenciação celular têm sido observados em superfícies de vidro revestidos com PAA e PAH, no qual pelo menos um dos polímeros é usado em pH na faixa de 7,0 (CHIEN et al., 2011; LU; SUN; SHEN, 2008; PATTABHI, 2014). Nas condições favoráveis de pH há um rearranjo conformacional do filme formado que fornece a rigidez e estabilidade química necessárias para o crescimento celular. Todos estes dados indicam que o uso de filmes automontados de PAA/PAH em pH 3,5 deve ser evitado em revestimentos para aplicações biomédicas.

Adicionalmente, as amostras contendo *LbL* foram incubadas em solução de acetato de prata e as nanopartículas foram reduzidas pela luz UV. De acordo com Machado et al. (2009) a presença dos polímeros e a escolha adequada da luz de excitação permite um melhor controle do tamanho e da distribuição das nanopartículas formadas sobre o filme. No presente trabalho, a formação das nanopartículas de Ag e sua incorporação à superfície da matriz nanotubular foi evidenciada através das análises por MEV. Apesar da tentativa de se obter dois perfis diferentes de nanopartículas, através de diferentes tempos de exposição à luz UV – 12 e 24 horas – as amostras apresentaram a mesma quantidade de Ag, cerca de 15µg/amostra, e o mesmo padrão de Ag(0) em sua superfície, como evidenciado pelas análises por ICP-MS e DRX, respectivamente.

O principal objetivo da incorporação das nanopartículas de Ag foi conferir ao material uma superfície com propriedade bactericida. As nanopartículas de Ag e seus sais são utilizados em uma grande variedade de materiais e dispositivos médicos para prevenir a

infecção, por exemplo, em curativos para feridas (SILVER; PHUNG; SILVER, 2006), pomadas para queimadura (KLASEN, 2000), cateteres (RUPP et al., 2004) e dispositivos de fixação óssea (GAO et al., 2014; LAN et al., 2013; MEI et al., 2014). Entretanto, no presente estudo nenhuma das amostras recobertas com Ag foi capaz de impedir a adesão bacteriana e a consequente formação de biofilme. O insucesso dos resultados microbiológicos deve-se provavelmente ao fato de não ter havido, ou ter havido em quantidade insuficiente, a formação de óxidos ou íons de Ag (Ag^+), estando presente somente Ag em sua forma totalmente reduzida e estável – $\text{Ag}(0)$. O principal mecanismo de ação bactericida deste metal se dá pela liberação de íons Ag^+ que alcançam a membrana bacteriana e desestabilizam sua estrutura, afetando também outros componentes celulares como o DNA e ribossomos (BRENNAN et al., 2015). Além da prevenção da liberação de íons pela presença de Ag em sua forma metálica – $\text{Ag}(0)$, as nanopartículas estavam fortemente protegidas entre a rede polimérica formada pelos polieletrólitos PAA/PAH, impedindo sua liberação e incorporação pelas células bacterianas, obedecendo a um segundo mecanismo de ação proposto para explicar a atividade antimicrobiana da Ag (QUADROS et al., 2013; YOON et al., 2007). Similar ao observado para explicar o perfil tóxico desses polímeros no presente estudo, o baixo pH teve uma atividade negativa com relação ao objetivo antimicrobiano almejado, ao possibilitar uma forte interação entre os polímeros e não permitir a liberação das nanopartículas de Ag.

Embora não tenhamos obtido resultados satisfatórios para a melhoria da biocompatibilidade e da atividade bactericida do grupo Ag neste estudo, sabemos que a correção de parâmetros como pH dos polímeros, número de camadas depositadas e concentração de Ag podem otimizar a superfície dos nanotubos de TiO_2 gerando uma superfície mais biocompatível com atividade bactericida.

Por outro lado, as amostras do grupo OniL apresentaram excelentes resultados na melhoria da biocompatibilidade do titânio. Vale salientar que esta linha de pesquisa, aliando biomateriais a produtos naturais, tem um caráter inovador e de grande impacto biotecnológico. Após a incorporação das diferentes concentrações de OniL sobre a superfície dos nanotubos, as amostras foram caracterizadas por uma série de técnicas físico-químicas que buscaram evidências da presença da lectina sobre os nanotubos.

De acordo com o voltamograma cíclico obtido nas medidas eletroquímicas, o eletrodo NT- TiO_2 apresentou um pico de redução, em -0,3 V. A irreversibilidade da redução eletroquímica observada pode ser tratada como um efeito eletrônico com base na natureza

semicondutora do TiO_2 (YU, 2011). As características do voltamograma apresentado podem estar relacionadas com o preenchimento de “buracos” profundos os quais estão associados a baixos locais coordenados de Ti (Ti^{3+}) em típicos NT- TiO_2 recozidos (BERTOLUZZINI et al., 2013). A eletroatividade muito baixa apresentada para o mesmo eletrodo no potencial acima de + 0,1 V foi interpretada como uma camada de bloqueio impedindo os processos de oxidação (ZHANG et al., 2014). Logo, o pico de corrente analisado neste trabalho foi em - 0,3V.

A negatificação dos nanotubos em solução de NaOH (pH 13,0) teve como objetivo aumentar a ligação entre a matriz nanotubular e a lectina OniL. Dal Acqua et al. (2015) relatam que a utilização deste sal em pH superior a 6,0 confere carga negativa a NT- TiO_2 favorecendo a adsorção de partículas carregadas positivamente. Bavykin et al. (2005) reportaram que nanotubos de TiO_2 negativamente carregados promovem interações eletrostáticas com cátions, se mostrando uma excelente matriz para ligação a proteínas. Segundo Nguyen et al. (2014), além de deixar a superfície negatificada, a incubação dos NT- TiO_2 com a solução de NaOH promove a formação de um filme fino (nanofibrila) induzido pela elevada concentração de ânions hidróxido. Por este motivo, após o procedimento de negatificação realizado neste trabalho, foi observado um decréscimo da corrente catódica em - 0,3V para o eletrodo NT-Neg, sendo importante destacar que a formação da fina camada ocorre sem afetar a estrutura ordenada dos nanotubos. Após a incubação com a lectina, o mesmo comportamento de diminuição da corrente catódica foi observado, podendo ser explicado pela interação da lectina aos NT-Neg. Esta consecutiva diminuição de corrente em todos os eventos citados ocorreu devido à perturbação na transferência de elétrons decorrente da modificação no potencial de interface do eletrodo, indicando que quanto maior a contribuição capacitiva, menor a visualização da corrente faradáica.

Do ponto de vista biológico, as amostras revestidas com OniL não exibiram citotoxicidade e foram capazes de melhorar significativamente a adesão celular sobre as superfícies dos NTs. Sabe-se que uma melhor adesão celular conduz a maior ativação das cascatas de sinalização intracelular através das integrinas associadas ao citoesqueleto de actina (DALBY et al., 2003; SCHLAEPFER; HAUCK; SIEG, 1999). Em nosso estudo, os osteoblastos apresentaram distribuição dos filamentos de actina típica da formação de pontos focais de adesão, que são essenciais para manter o formato, migração e proliferação da célula ao substrato (STAN et al., 2014). A funcionalização dos NTs com a OniL favoreceu a rápida colonização do substrato pelos osteoblastos, permitindo a proliferação das células e a

atividade osteogênica. Essa melhora na biocompatibilidade dos NTs de titânio revestidos com OniL pode ter outras consequências. Devido ao seu papel imunomodulador a OniL pode regular a resposta inflamatória local auxiliando na regeneração óssea.

Neste estudo, as amostras revestidas com OniL foram capazes de induzir um aumento significativo da produção de fosfatase alcalina pelos osteoblastos, nos períodos de 48 e 72 horas de incubação. Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese, deposição e mineralização da matriz extracelular óssea. Neste processo, a produção de fosfatase alcalina pode ser um dos parâmetros usados em modelos *in vitro* para avaliar o efeito do biomaterial sobre a atividade do tecido ósseo (ORÉFICE et al., 2012). O aumento da atividade desta enzima sugere uma indução no processo de biomineralização. Além disso, durante o crescimento ósseo e durante a remodelagem do osso adulto, os osteoblastos secretam vesículas ricas em cálcio para o osteóide em calcificação (JOHNSON, 2000). Considerando o importante papel do cálcio neste processo, a dosagem deste íon foi realizada e os resultados obtidos demonstraram uma maior quantidade em NT-TiO₂ recobertos com OniL, ratificando o potencial osteogênico dessas amostras. Apesar dos NTs-TiO₂ revestidos com OniL não apresentarem ação direta sobre as bactérias a presença da lectina com o seu potencial mitogênico pode levar a uma rápida colonização do substrato, diminuindo a chance de que este venha ser colonizado por bactérias e outros microrganismos.

O conjunto de resultados observados nas amostras do grupo OniL sugerem uma melhoria na biocompatibilidade *in vitro* destes materiais. Embora mais estudos sejam necessários para uma melhor investigação de outros parâmetros envolvidos na osseointegração, assim como a necessidade de ensaios *in vivo*, nós destacamos o caráter inovador da nossa pesquisa em aliar lectinas à implantes. Estudos futuros ainda são necessários para uma melhor elucidação das respostas fisiológicas de outros tipos celulares face a funcionalização com OniL ou outras lectinas. Esperamos que nossos estudos possam contribuir de forma significativa na melhoria da qualidade desses biomateriais.

7 CONCLUSÕES

- a) Os NTs obtidos neste estudo, na faixa de 70 nm, apresentaram uma excelente biocompatibilidade favorecendo tanto a adesão quanto a proliferação celular corroborando a utilização de NTs com diâmetros abaixo de 100 nm
- b) A presença de NTs na fase anatase e o processo de anodização do titânio utilizados em nosso estudo favoreceram a adesão e a proliferação celular de osteoblastos.
- c) O uso de filmes poliméricos de PAA/ PAH no pH de 3,5 sobre superfícies nanotubulares de TiO₂ não é capaz de favorecer aos processos de adesão e proliferação celular de osteoblastos, apresentando-se tóxicos nesta condição.
- d) Os nanotubos de TiO₂ se mostraram ineficientes como agentes bactericidas.
- e) O revestimento de nanotubos de TiO₂ com a lectina OniL foi capaz de promover uma melhora significativa na biocompatibilidade deste material;
- f) Nossos resultados apontam para o potencial biotecnológico dos NTs revestidos com OniL como alternativa para o revestimento de biomateriais.

REFERÊNCIAS

- ABUKAWA, H. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: A review of scaffolds and implant coatings. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.50, n.2, p.205-216, 2006.
- AGARWAL, A.; WEIS, T. L.; SCHURR, M. J. Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells. **Biomaterials.**, Guilford, v.31, p.680-690, 2010.
- ANSARI, M. A.; KHAN, H. M.; KHAN, A. A.; Interaction of silver nanoparticles with *Escherichia coli* and their cell envelope biomolecules. **J. Basic Microbiol.**, Berlin, v.54, p.905- 915, 2014.
- ARCAM EBM SYSTEM. **Grade 2 Titanium**. MoIndal: Arcam AB, 2008.
- ARENAS-HERRERA et al. Decellularization for whole organ bioengineering. **Biomed. Mater.**, Bristol, v.8,n.1, p.104-106, 2013.
- BAINS, J.S. et al. Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1723, p.163-174, 2005.
- BARBUCCI, R. **Integrated Biomaterials Science**. New York: Kluwer Academic: Plenum Publishers, 2002.
- BASHA, R. Y.; SAMPATH KUMAR, T. S.; DOBLE, M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. App.**, Amsterdam, v.57, p. 452-463, 2015.
- BATH, S.V. **Biomaterial**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2002.
- BATISTA, T. et al. Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica. **Implantnews.**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 95-101, 2010.
- BAUER, T. W.; SCHILS, J. The pathology of total joint arthroplasty: Mechanisms of implant failure. **Skelet. radiol.**, Berlin, v.28, p.483-497, 1999.
- BAVYKIN, D.V. et al. A novel cation-binding TiO₂ nanotube substrate for electro-and bioelectrocatalysis. **Electrochem. Commun.**, Amsterdam, v.7, p.1050-1058, 2005.
- BERTOLUZZINI, L. et al. Interpretation of Cyclic Voltammetry Measurements of Thin Semiconductor Films for Solar Fuel Applications. **J. Phys. Chem. Lett.**, Washington, v. 4, p. 1334-1339, 2013.
- BESSAUER, L.H. **Desenvolvimento e caracterização de nanotubos de TiO₂ em implantes de titânio**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BIOFABRIS. **Biomateriais**. Disponível em: <<http://biofabris.com.br/pt/biomateriais/>>. Acesso em: 21 jun. 2015.

BLAKER, J.; NAZHAT, S.; BOCCACCINI A. Development and characterisation of silver-doped bioactive glass-coated sutures for tissue engineering and wound healing applications. **Biomaterials.**, Guilford, v. 25, n. 7, p.1319–1329, 2004.

BOHNER, M. et al. Syththesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications. **Biomatter.**, Philadelphia, v.3, n. 2, p.2503;1- 2503;15, 2013.

BRAMMER, K. S. et al. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. **Acta Biomater.**, Oxford, v.5, p.3215–3223, 2009.

BRANEMARK, P.; BREINE, U.I. Regeneration of bone marrow: A clinical and experimental study following removal of bone marrow by curttage. **Acta Anat. (Basel).**, Basel, v.59, p.1-46, 1969.

BRANEMARK, P.I. **The Branemark novum protocol for same day teeth: a global perspective**. Berlim: Quintessence Books, 2001.

BRENNAN, S.A. et al. Silver nanoparticles and their orthopaedic applications. **Bone Joint J.**, London, v. 97-B, n.5, p. 582-589, 2015.

CALLISTER, W. D. **Materials Science and Engineering**. [s.p.]: Elsevier B.V., 2009, v. 29.

CAO, H.; LIU, X. Silver nanoparticles-modified films versus biomedical device-associated infections. **Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.**, Hoboken, v.2, p.670–684, 2010.

CARVALHO, E. V. M. M. et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in Serum of the Amazonian Fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Fish. Sci.**, Tokyo, v.78, n.1, p.01-09, 2012.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam , v.28, p.580–588, 2010.

CHAN, G.; MOONEY, D.J. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v.26, p.382-392, 2008.

CHANMANCE, W. Titania nanotubes from pulse anodization of titanium foils. **Electrochem. Commun.**, Amsterdam, v. 9, p. 2145-2149, 2007.

CHARNLEY, J. Surgery of the hip-joint: present and future developments. **Br. Med. J.**, London, v.1, n. 5176, p. 821-826, 1960.

CHEUNG, R. C. et al. Chitosan: An update on potential Biomedical and Pharmaceutic Applications. **Mar. Drugs.**, Basel, v.13, n.8, p.5156-5186, 2015.

CHIEN, H.W. et al. Modulation of the functions of osteoblast-like cells on poly(allylamine hydrochloride) and poly(acrylic acid) multilayer films. **Colloids Surf. B Biointerfaces.**, Amsterdam, v. 88, n.1, p. 297-303, 2011.

CHIEN, H.W. et al. Modulation of hemocompatibility of polysulfone by polyelectrolyte multilayer films. **Colloids Surf. B Biointerfaces.**, Amsterdam, v.77, n.2, p.270-278, 2010.

CINCO estados recebem mutirão de cirurgia ortopédica. 2012. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/09/cinco-estados-recebem-mutirao-de-cirurgia-ortopedica>>. Acesso em: 04 jan. 2015

DAL ACQUA, N. et al. Characterization and Application of Nanostructured Films Containing Au and TiO₂ Nanoparticles Supported in Bacterial Cellulose. **J. Phys. Chem. C**, Washington, v. 119, p. 349-349, 2015.

DALBY, M. J. et al. Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time. **Biomaterials.**, Guilford, v. 24, p. 927–935, 2003.

DAVEY, M. E. et al. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 64, n.4, p. 847–867, 2000.

DAVIS, J. R. **Handbook of Materials for Medical Devices**. Materials Park: ASM International p. 310, 2003.

DEDÃO de uma múmia pode ser prótese mais antiga do mundo, diz estudo. **São Paulo**, 04 out. 2012. Disponível em: < <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2012/10/dedao-de-mumia-pode-ser-protese-mais-antiga-do-mundo-diz-estudo.html>>. Acesso em 05 jan. 2015.

DESAI, M.S.; LEE, S.W. Protein-based functional nanomaterial design for bioengineering applications. **Wiley Interdiscip. Ver. Nanomed. Nanobiotechnol.**, Hoboken, v.7, p.69-97, 2015.

DIAS, R. C. M. **Síntese, caracterização e avaliação preliminar de citotoxicidade da matriz porosa de nanocompósito biodegradável**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

FABBRI, P. et al. Lifetime estimation of a zirconia–alumina composite for biomedical applications. **Dent. Mater.**, Washington, v.30, p.138-142, 2014.

FRANCI, G. et al. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. **Molecules.**, Basel, v. 20, p.8856-8874, 2015.

GALLO, J.; HOLINKA, M.; MOUCHA, C.S. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. **Int. J. Mol. Sci.**, British Columbia, v.15, p.1384-13880, 2014.

GAO, A. et al. The effects of titânia nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bactéria and osteoblastos. **Biomaterials.**, Guilford, v.35, p.4223-4235, 2014.

GAUTO, D. F. et al. Structural basis for ligand recognition in a mushroom lectin: Solvent structure as specificity predictor. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.346, p.939–948, 2011.

GEETHA, M.; SINGH, A.K.; GOGIA, A.K. Ti Based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. **Prog. Mater. Sci.**, Oxford, v.54, p.397-425, 2009.

GHEORGHE, M.; GUISEPPI-ELIE, A. Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization. **Biosens. Bioelectron.**, Oxford, v.19, n.2, p.95-102, 2003.

GITTENS, R. A. et al. Implant osseointegration and the role of microstructures: lessons for spine implants. **Acta Biomater.**, Oxford, v.10, p.3363-3371, 2014.

GONG, D. et al. Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. **J. Mater. Res.**, Pittsburgh, v. 16, p.3331–3334, 2001.

GONGADZE, E. et al. Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface. **Int. J. Nanomedicine**, Auckland, v.6, p.1801–16, 2011.

HA, T. L. B. et al. Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application. In: ANDRADES, J. A. **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**. Rijeka: Intech, 2013, cap.11, p.247-274.

HALL-STOODLEY, L. et al. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat. ver. Microbiol.**, London, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2008.

HUISKES, R.; WEINANS, H.; RIETBERGEN, B. V. The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, Philadelphia, v.274, p.124-134, 1992.

JAMES, D. W.; GHOSH, M.; ETZLER, M. E. Production of a Lectin in Tissue Cultures of *Dolichos biflorus*. **Plant. Physiol.**, Lancaster, v.77, n.3, p.630-634, 1985.

JAYESH, R. S.; DHINAKARSAMY, V. Osseointegration. **J. Pharm. Bioallied. Sci.**, Mumbai, v.7, p.226-229, 2015.

JOHNSON, L. R. **Fundamentos de fisiologia médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KAO, C. T. et al. The cytotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. **Eur. J. Orthod.**, Oxford, v. 29, n. 2, p.198-203, 2007.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quim. Nova.**, São Paulo, v.23, n.3, 2000.

KLASEN, H. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns.**, Guildford, v.26, p.131-138, 2000.

KULKARNI et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. **Nanotechnology.**, Bristol, v. 26, n. 6, p. 1-18, 2015.

KURTZ, S.M. et al. Advances in zircônia toughened alumina biomaterials for total joint replacement. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.**, Amsterdam, v.31, p. 107-116, 2014.

LAN, M.Y. et al. Both Enhanced Biocompatibility and Antibacterial Activity in Ag-Decorated TiO₂ Nanotubes. **PLoS one.**, San Francisco, v. 8, n.10, p.1-8, 2013.

LANDIM, A. et al. **Equipamentos e tecnologias para saúde: oportunidades para uma inserção competitiva da indústria brasileira.** Rio de Janeiro: BNDES Setorial, 2003.

LEWIS, S. P. et al. Prediction of glycoprotein secondary structure using ATR-FTIR. **Vib. Spectrosc.**, Philadelphia, v.69, p.21–29, 2013.

LONG, M.; RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. **Biomaterials.**, Guilford, v.19, n.20, p.1621- 1639, 1998.

LU, Y.; SUN, J.; SHEN, J. Cell Adhesion Properties of Patterned Poly(acrylic acid)/ Poly(allylamine hydrochloride) Multilayer Films Created by Room-Temperature Imprinting Technique. **Langmuir.**, Washington, v.24, p.8050-8055, 2008.

MACEDO, M. L. R.. et al. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, New York, v.146, p.486-498, 2007.

MACHADO, G. et al. Silver Nanoparticles Obtained in PAH/PAA-Based Multilayers by Photochemical Reaction. **J. Phys. Chem. C**, Washington, v.113, p.19005–19010, 2009.

MACIEL, E. V. M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals.**, London, v.32, n.1, p.57-60, 2004.

McCLARENCE, E. **Close to the Edge: Brånemark and the Development of osseointegration.** Berlin: Quintessence Books, 2003.

MEI, S. et al. Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. **Biomaterials.**, Guilford, v.35, n.14, p.4255-4265, 2014.

MELO, C. M. L. et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 408, n. 1-2, p. 113-119, 2011.

MELO, C. M. L.; CASTRO, M. C. A. B.; OLIVEIRA, A. P. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytother. Res.**, London, v.24, n.11, p.1631-1636, 2010.

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

MISQUITH, S.; RANI, P.G.; SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.269, n.48, p.30393-30401, 1994.

MORAIS, L. S.; GUIMARAES, G. S.; ELIAS, C. N. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial.**, Maringá, v.12, n.6, p.48-53, 2007.

NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. **J. R. Soc. Interface**, London, v.5, p. 1137-1158, 2008.

NGUYEN, N. H.; BAI, H. Photocatalytic removal of NO and NO₂ using titania nanotubes synthesized by hydrothermal method. **J. Environ. Sci. (China)**, Beijing, v.26, n.5, p.1180-1187, 2014.

NUNES, E. S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol., Part B Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v.159, n.1, p.57-63, 2011.

OH S. et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.106, p.2130–2135, 2009.

OH, S. et al. Bioceramics for tissue engineering applications – A review. **Am. J. Biochem. Biotechnol.**, New York, v.2, n.2, p.49-56, 2006.

OLEDZKA, E. et al. Selenium-Substituted Hydroxyapatite/ Biodegradable Polymer/ Pamidronate Combined Scaffold for the Therapy of Bone Tumour. **Int. J. Mol. Sci.**, British Columbia, v.14 n.16, p. 22205-22215, 2015.

OLIVEIRA, M. D. L, et al. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. **Sens. Actuators B Chem.**, Lausanne, v.155, p.789-795, 2011.

OLIVEIRA, L. S. A. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – Métodos de análise e perspectivas futuras. **R. Ci. méd. biol.**, Rio Grande do Sul, v.9, n.1, p.37-44, 2010.

ORÉFICE, R. L. et al. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

PARK J, et al. Narrow window in nanoscale dependent activation of endothelial cell growth and differentiation on TiO₂ nanotube surfaces. **Nano Lett.**, Washington, v.9, p.3157–3164, 2009.

PATTABHI, S. R. et al. Human mesenchymal stem cell osteoblast differentiation, ecm deposition, and biomineralization on pah/paa polyelectrolyte multilayers. **J. Biomed. Mater. Res. Part A.**, Hoboken, v.103, p.1818–1827, 2015.

PEREIRA, D. S. et al. Topical application effect of the isolectin hydrogel (Cramoll 1,4) on second-degree burns: experimental model. **J. Biomed. Biotechnol.**, Cairo, v.2012, [s.p], 2012.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant. Physiol.**, Lancaster, v.109, n.2, p.347-352, 1995.

PEUMANS, W. J. et al. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v.491, p.27-54, 2001.

PHILLIPS, P. L.; YANG, Q., DAVIS, S., et al. Antimicrobial dressing efficacy against mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on porcine skin explants. **Int. Wound. J.**, Oxford, v.12, n.4, p.469-483, 2013.

PIZON, A. F. et al. Prosthetic Hip-associated Cobalt toxicity. **J. Med. Toxicol.**, Philadelphia, v.9, p.416-417, 2013.

POHLEVEN, J.; ŠTRUKELJ, B.; KOS, J. Affinity chromatography of lectins. In: MAGDELDIN, S. **Affinity Chromatography**. Rijeka: InTech. 2012, p. 49–74.

PRECHEUR, H. V. Bone graft materials. **Dent. Clin. N. Am.**, Philadelphia, v.51, p.729-746, 2007.

QUADROS, C. et al. Chitosan/Carboxymethylcellulose/Ionic Liquid/Ag(0) Nanoparticles Form a Membrane with Antimicrobial Activity. **J. Nanotechnol.**, Cairo, v.2013, 9p., 2013.

RATNER et al. **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**. 2.ed. London: Academic Press, 2 ed, 2004.

REDDY N.; YANG, Y. Potential of plant proteins form medical applications. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v.29, p.490-498. 2011.

RENZ, R. P. **Avaliação da osseointegração de implantes de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfícies**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

REYES-GALLARDO, E.M. et al. Polymer-nanoparticles composites in bioanalytical sample preparation. **Bioanalysis.**, London, v.7, p.1723-1730, 2015.

RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J. Strategies for the prevention of microbial biofilm formation on silicone rubber voice prostheses. **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, Hoboken, v.81, n.2, p.358–370, 2007.

ROMANÒ, C. L. et al. Antibacterial coating of implants in orthopaedic and trauma: classification proposal in a evolving panorama. **J. Orthop. Surg. Res.**, London, v.10, p.157. 2015.

ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: Synthesis and applications. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, Weinheim, v.50, p.2904–2939, 2011.

RUPP, M. E. et al. Effect of silver-coated urinary catheters: efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. **Am. J. Infect. Control.**, St. Louis, v. 32, p.445-450, 2004.

SAIZ, E. et al. Perspective on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.29, p.103-115, 2015.

SAMBHY, V. et al. Silver bromide nanoparticle /polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 128, p.9798–9808, 2006.

SANTOS L. A. **Desenvolvimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. 2002. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SCHLAEPFER, D. D.; HAUCK, C. R.; SIEG, D. J. Signaling through focal adhesion kinase. **Prog. Biophys. Mol. Bio.**, New York, v.71, p.435–478, 1999.

SCHLENOFF, J. B. Charge Balance and Transport in Ion-Paired Polyelectrolyte Multilayers. In: SCHLENOFF, J. B. **Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials**. Weinheim: Wiley, 2012, p 281–320.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology.**, Oxford, v.14, p.53–62, 2004.

SHIN DH, et al. Wettability changes of TiO₂ nanotube surfaces. **Nanotechnology.**, Bristol, v.22, n.31, p.1-7, 2011.

SHIRATORI, S. S.; RUBNER, M. F. pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes, **Macromolecules.**, Washington, v.33, p.4213–4219, 2000.

SILVA, C. D. C. et al. Purification and characterization of a mannose recognition lectin from *Oreochromis niloticus* (Tilapia Fish): cytokine production in mice splenocytes. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 166, n.2, p.424-435, 2012.

SILVA, K. L. **Obtenção de nanocompósitos de alumina-zircônia para aplicação como biomaterial**. 2011. Dissertação (Mestrado). 2011. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SILVER, S.; PHUNG, L. T.; SILVER, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.33, p.627-634, 2006.

SPEZIALE, P. et al. Protein-based biofilm matrices in staphylococci. **Front Cell Infect. Microbiol.**, Lausanne, v.4, n.171, [s.p.], 2014.

STAN, M. S. et al 2014. Effects of titanium- based nanotube films on osteoblast behavior in vitro. **J. Biomed. Mater. Res. Part A.**, Hoboken, v.103, n.1, p.48-56, 2014.

SUL, Y. T. et al. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. **Med. Eng. Phys.**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 329–46, 2001.

SWAMI, N.; CUI, Z.; NAIR, L. S. Titania Nanotubes: Novel Nanostructures for Improved Osseointegration. **J. Heat. Transfer.**, New York, v.133, n.3, 7p., 2011.

TANSAZ, S.; BOCCACCINI, A.R. Biomedical applications of Soy protein: A brief overview. **J. Biomed. Mater. Res. A**, Hoboken, 2015. No prelo.

THURBER A. E; OMENETTO, F.G., KAPLAN, D.L. *In vivo* bioresponses to silk proteins. **Biomaterials.**, Guilford, v.71, p.145-157, 2015.

TSUCHIYA, H. et al. Self-organized porous TiO₂ and ZrO₂ produced by anodization. **Corros. Sci.**, Philadelphia, v. 47, p. 3324-3335, 2005.

TSUTSUI, S. et al. Novel mannose-specific lectins found in torafugu, *Takifugu rubripes*: A review. **Comp. Biochem. Physiol. Part D., Genomics Proteomics.**, Amsterdam, v.1, n.1, p.122-127, 2006.

UCHIDA, M. et al. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. **J Biomed. Mater. Res. A.**, Hoboken, v. 64, n. 1, p. 164–170, 2003.

VASCONCELOS, A. G. et al. **Implantes osseointegrados: Aplicações intra-orais**. 1. ed. São Paulo: Pancast, 2000.

VEERACHAMY et al. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. **Proc. Inst. Mech. Eng. H.**, London, v.228, n.10, p.1083-1099, 2014.

VETTER, K. J. **Electrochemical kinetics, theoretical and experimental aspects**. New York: Academic Press, 1967.

VON RECUM, A. F.; LABERGE M. Educational goals for biomaterials science and engineering: prospective view. **J. Appl. Biomater.**, New York, v.6, n.2, p.137-144, 1995.

WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, M. T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WANG, R.M.; CHRISTMAN, K.L. Descellurized myocardial matrix hydrogels: In basic research and preclinical studies. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, Amsterdam, 2015. No prelo.

WONG, J. Y; BRONZINO, J. D. **Biomaterials**. Oxford: Taylor e Francis Group, 2007.

YAMADA, W.A. et al. Enhanced in vitro biological activity generate by surface characteristic of anodically oxidized titanium – the contribution of the oxidation effect. **eCM. J.**, Glasgow, v.29, p.290-302, 2015.

YAMANAKA M, HARA K, KUDO J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.71, p.7589–7593, 2005.

YANG, D. J. Thickness-conversion ratio from titanium to TiO₂ nanotube fabricated by anodization method. **Mater. Lett.**, Amsterdam, v. 2, p. 775–779, 2008.

YAO, C.; PERLA, V. et al. Anodized Ti and Ti₆Al₄ V possessing nanometer surface features enhances osteoblast adhesion. **J. Biomed. Nanotechnol.**, Stevenson Ranch, v.1, p.68-73, 2005.

YASZEMSKI, M. J. et al. **Biomaterials in orthopedics**. New York: Marcel Dekker Inc., 2004.

YOO, D.; SHIRATORI, S. S.; RUBNER, M. F. Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes, **Macromolecules.**, Washington, v.31, p.4309–4318, 1998.

YOON, K. Y et al. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v. 373, n. 2-3, p. 572–575, 2007.

YU, W. K.; QIU, J.; ZHANG, F. Q. In vitro corrosion study of different TiO₂ nanotube layers on titanium in solution with serum proteins. **Colloids Surf. B.**, Amsterdam, v.84, p.400–405, 2011.

ZHANG, Q. et al. Density of Deep Trap States in Oriented TiO₂ Nanotube Arrays. **J. Phys. Chem. C**, Washington, v.18, n.31, p. 18207–18213, 2014.

ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomater.**, Oxford, v.7, n.7, p.2769-2781, 2011.