

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Keicyanne Fernanda Lessa dos Anjos

**BIOFUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO (CP) PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

RECIFE

2021

Keicyanne Fernanda Lessa dos Anjos

**BIOFUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO (CP) PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Coorientadora: Dra. Janaina Viana de Melo

RECIFE

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

A599b Anjos, Keicyanne Fernanda Lessa dos.
Biofuncionalização da superfície do titânio (cp)
para aplicações biomédicas / Keicyanne Fernanda Lessa
dos Anjos. — Recife: [s.n.], 2021.
100 p. il., graf. 30 cm.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia
em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de
Figueiredo; coorientadora: Janaina Viana de Melo.

1. Titânio. 2. Materiais Biocompatíveis. 3. Lectinas.
4. Nanopartículas de prata. 5. Teste de Materiais. I.
Regina Célia Bressan Queiroz de, Figueiredo. II. Melo,
Janaina Viana de. III. Título..

CDU 595.771

Keicyanne Fernanda Lessa dos Anjos

**BIOFUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO (CP) PARA
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como pré-requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 30/09/2021

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a Janaina Viana de Melo
Centro Universitário UniFBV Wyden

Dr^a Isabel Renata de Souza Arruda
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

Dr Thiers Araujo Campos
Centro Universitário Estácio

Dr^a Tatiany Patricia Romão Pompílio de Melo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr Fabio Rocha Formiga
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

À minha avó e para sempre mãe, Maria Tereza (*in memoriam*).

Aos meus pais, Fernando e Carmem.

Ao meu amor, Felipe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, em primeiro lugar, por ser o meu universo, minha direção e meu porto seguro. Mesmo quando eu não entendo, Teus planos sempre serão melhores que os meus. Obrigada por me sustentar ao longo deste trabalho, toda força que eu tive e que tenho, vem de Ti.

À minha família, por todo incentivo e apoio desde as primeiras letras no pré-escolar até a conclusão desta tese. Painho e Mainha, eu amo vocês. Muito obrigada!

Ao meu marido Felipe, tão amoroso, orgulhoso e paciente. Eu não conseguiria sem você “segurando a minha onda”. Obrigada por não ter soltado a minha mão. Te amo!

À minha orientadora, Dra. Regina Bressan, por todos os ensinamentos, recomendações, puxões de orelha e confiança (no meu trabalho e na minha capacidade). Obrigada por todas as oportunidades ao longo desses 10 anos de parceria, por ter sido tão humana e compreensiva quando eu mais precisei. Muito obrigada!

À minha coorientadora, Dra. Janaina Melo, que abriu as portas do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) para o início desta pesquisa, me apresentou aos nanotubos de titânio e compartilhou tanto conhecimento, tornando tudo mais leve.

À Dra. Giovanna Machado e todo o seu grupo de Nanomateriais do CETENE, pela disponibilidade e colaboração na área de materiais que foram fundamentais para a execução deste trabalho, em especial à Rhauanne Galvão.

À Dra. Mary Aranda, por ceder a lectina utilizada neste estudo, pelo suporte nas análises estatísticas, por sua imensurável amizade e conversas altamente necessárias.

Aos verdadeiros amigos que pude fazer ao longo dos anos no Laboratório de Microscopia e Microanálise do CETENE.

Ao Dr. Igor Rocha pela cooperação nos testes microbiológicos.

Ao CETENE e ao Instituto Aggeu Magalhães por terem cedido suas estruturas para realização deste trabalho.

À FACEPE pelo suporte financeiro.

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

“É justo que muito custe, o que muito vale” (Santa Teresa D’Ávila).

ANJOS, Keicyanne Fernanda Lessa dos. **Biofuncionalização da superfície do titânio (cp) para aplicações biomédicas**. 2021. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

O titânio e suas ligas são um dos principais biomateriais utilizados em implantes ortopédicos e ortodônticos, devido à sua boa resistência à corrosão e excelente biocompatibilidade. Porém, algumas desvantagens como, por exemplo, uma integração ineficaz e demorada ao tecido ósseo circundante, podem prolongar o processo de cicatrização e favorecer infecções locais, prejudicando o sucesso desse biomaterial na prática clínica. Nesse sentido, estratégias para modificar a superfície do titânio com biomoléculas para favorecer a adesão celular e a osteogênese do tecido ósseo têm sido investigadas. Neste estudo utilizamos diferentes abordagens para modificar a superfície com o objetivo de melhorar sua biocompatibilidade e conferir a este material atividade antibacteriana. Para isso, os nanotubos de dióxido de titânio (NT-TiO₂) foram obtidos de forma eficiente por anodização seguida de anelamento por tratamento térmico. Os TiO₂NTs resultantes foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução e EDS. Nossos resultados mostraram a formação de NTs-TiO₂ de maneira regular e bem distribuída. Os NTs-TiO₂ foram então recobertos com filmes automontados de polieletrólitos de cloridrato de polialilamina (PAH) e ácido poliacrílico (PAA), seguidos da deposição de nanopartículas de prata (AgNPs) e da lectina de *Bothropus leucurus* (BIL). Alternativamente, a BIL foi adsorvida diretamente aos NTs-TiO₂ por *spin coating*. A incorporação com sucesso de BIL e AgNPs na superfície de TiO₂NTs, foi demonstrada por voltametria cíclica (CV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e espectro infravermelho de transformada de Fourier de reflexão total atenuado (ATR-FTIR). Além disso, os seguintes parâmetros biológicos 1) adesão e viabilidade celular, 2) atividade de fosfatase alcalina (como indicador do processo de osteogênese) das diferentes amostras de TiO₂ foram investigados em células de osteossarcoma humano (HOS). Em comparação com as amostras de TiCp, a modificação das superfícies de TiCp testadas, exceto aquelas revestidas com AgNPs, favoreceram a adesão, proliferação e o aumento da atividade de ALP em células semelhantes a osteoblastos, sugerindo seu uso para melhorar a qualidade e biocompatibilidade de biomateriais à base de titânio. O tratamento dos nanotubos de TiO₂ com BIL a 200 µg / mL e incorporados por meio de filmes auto-montados de PAH / PAA (dip coating) apresentou os melhores resultados para adesão, viabilidade e produção de fosfatase alcalina. Além disso, esse tratamento foi o único capaz de inibir o crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus*. Assim, nossos dados apontam para o potencial uso da lectina BIL como uma molécula bioativa para melhorar a biocompatibilidade dos implantes de titânio, favorecendo a adesão, osseointegração e reduzindo o risco de infecção.

Palavras-chave: Nanotubos de dióxido de titânio; Biofuncionalização; Lectinas; Nanopartículas de prata.

ANJOS, Keicyanne Fernanda Lessa dos. **Titanium (cp) surface biofunctionalization for biomedical applications**. 2021. Thesis (PhD in Bioscience and Biotechnology on Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2021.

ABSTRACT

Titanium and its alloys are one of the main biomaterials used in orthopedic and orthodontic implants, due to its good corrosion resistance and excellent biocompatibility. However, some disadvantages such as, for example, an ineffective and time-consuming integration to the surrounding bone tissue, which can prolong the healing process and favor local infections impairing the success of this biomaterial in the clinical practice. In this regard strategies to modify the surface of Titanium with biomolecules to favors cell adhesion and osteogenesis of bone tissue have been investigated. In this study we used different approaches to modify the surface aiming to improve its biocompatibility and confer to this material antibacterial activity, for this, Titanium dioxide nanotubes (NT-TiO₂) have efficiently obtained by anodization followed by thermal annealing treatment. The resulting TiO₂NTs were characterized by high-resolution scanning electron microscopy and EDS. Our results showed the formation of TiO₂NTs in a regular and well distributed manner. TiO₂-NTs were than coated with self-assembled films of polyallylamine hydrochloride (PAH) and polyacrylic acid (PAA) polyelectrolytes, followed by the deposition of silver nanoparticles (AgNPs) and *Bothropus leucurus* lectin (BIL). Alternatively, the BIL was adsorbed directly to TiO₂-NTs by spin coating. The successfully incorporation of OniL and AgNPs on the surface of TiO₂NTs, by, was demonstrated by cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIE) and attenuated total re-reflection-Fourier transform infrared spectrum (ATR-FTIR). Further, the the following biological parameters 1) cell adhesion and viability, 2) alkaline phosphatase activity (as indicator of osteogenesis process) and antibacterial activity of the different TiO₂ samples were investigated in Human Osteosarcoma Cells (HOS). Compared to Ticp samples, the surfaces modification of Ticp tested, except those coated with AgNPs favored adhesion, proliferation, and increased of the ALP activity in osteoblast-like cells, suggesting its use to improve the quality and biocompatibility of titanium-based biomaterials. The treatment of TiO₂ nanotubes with BIL at 200 µg/mL and incorporated through self-assembled PAH/PAA films (dip coating) showed the best results for adhesion, viability, and alkaline phosphatase production. In addition, this treatment was the only able to inhibit the bacterial growth in addition to being the only sample to show activity bactericidal. Thus, our data point to the use of lectin BIL as a potential bioactive molecule to improve the biocompatibility of titanium implants, favoring adhesion, osseointegration and reducing the risk of infection.

Keywords: Titanium dioxide nanotubes; Biofunctionalization; Lectins; Silver nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Diagrama com diversas aplicações dos bioimplantes	19
Figura 2	– Classificação dos biomateriais	20
Figura 3	– Tipos celulares do tecido ósseo	24
Figura 4	– Representação do processo de osteogênese	25
Figura 5	– Processo de osseointegração em superfícies de titânio após aplicação <i>in vivo</i> .	28
Figura 6	– Processo de formação do biofilme	30
Figura 7	– Estrutura cristalina do titânio.	32
Figura 8	– Principais causas das falhas em implantes ortopédicos.	33
Figura 9	– Organização hierárquica do tecido ósseo em macro e nanoescala	34
Figura 10	– Diferentes técnicas para modificação de superfícies de biomateriais.	35
Figura 11	– Esquema da anodização eletroquímica	37
Figura 12	– Estrutura dos nanotubos de titânio	38
Figura 13	– Técnicas de deposição de filmes finos	40
Figura 14	– Esquema de automontagem de filmes finos por <i>Layer by Layer</i>	41
Figura 15	– Possíveis modos de ação antimicrobiana de nanopartículas de prata	44
Figura 16	– Nanotubos de TiO ₂ impregnados com Ag por diferentes protocolos e reduzidos 12h por luz UV	57
Figura 17	– Espectros de EDS de nanotubos de TiO ₂ impregnados com Ag por diferentes protocolos	58
Figura 18	– Avaliação da adesão das células HOS sobre as amostras impregnadas com Ag por diferentes protocolos.	60
Figura 19	– Amostras de titânio com diferentes tratamentos sobre a superfície	63
Figura 20	– Espectros de EDS para diferentes amostras de titânio	64
Figura 21	– FTIR dos diferentes grupos de amostras	66

Figura 22–	Curvas de polarização cíclica e impedância para amostras de titânio puro e nanotubos de TiO ₂	68
Figura 23–	Curvas de polarização cíclica e impedância para amostras de nanotubos de TiO ₂ e recobertas com Ag em diferentes concentrações.	69
Figura 24–	Curvas de polarização cíclica e impedância para amostras de nanotubos de TiO ₂ e recobertas com diferentes concentrações da lectina BIL por <i>dip coating</i>	70
Figura 25–	Curvas de polarização cíclica e impedância para amostras de nanotubos de TiO ₂ e recobertas com diferentes concentrações da lectina BIL por <i>spin coating</i>	71
Figura 26–	Avaliação da adesão de células HOS cultivadas sobre as diferentes amostras	74
Figura 27–	Avaliação morfológica de células HOS cultivadas sobre as diferentes amostras	75
Figura 28–	Inibição do crescimento bacteriano frente as diferentes amostras	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Citotoxicidade da lectina BIL sobre osteoblastos	61
Gráfico 2	– Quantificação da adesão de células HOS sobre as diferentes amostras	73
Gráfico 3	– Viabilidade das células HOS cultivadas sobre as diferentes amostras	76
Gráfico 4	– Atividade da fosfatase alcalina em células HOS cultivadas sobre as diferentes amostras	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	– Prata
AgNPs	– Nanopartículas de prata
ATP	– Adenosina trifosfato
BIL	– <i>Bothropus leucurus Lectin</i>
BMP - 2	– Proteína morfogenética 2
Ca	– Cálcio
CETENE	– Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
DAPI	– <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DRX	– Difração de Raios X
EDS	– Espectroscopia de energia dispersiva
EPS	– Exopolissacarídeo
EIE	– Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
FCS	– Fluido Corporal Simulado
FDA	– <i>US Food and Drug Administration</i>
FTIR	– Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HOS	– <i>Human Osteosarcome cell line</i>
LbL	– <i>Layer by Layer</i>
LNLS	– Laboratório Nacional de Luz Síncroton

MEC	– Matriz Extracelular
MEM	– <i>Minimun Essential Media</i>
MEV	– Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	– <i>3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NT-TiO₂	– Nanotubos de dióxido de titânio
PAA	– Ácido poliacrílico
PAH	– Hidrocloro de polialilamina
PBS	– Tampão fosfato salino
PTH	– Hormônio da Paratireoide
RGD	– Arg-Gly-Asp
ROS	– Espécies reativas de oxigênio
SFB	– Soro fetal bovino
Ti	– Titânio
Ti cp	– Titânio comercialmente puro
UV	– Ultravioleta
VC	– Voltametria Cíclica

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO-CONCEITUAL	18
1.1	Biomateriais	18
1.1.1	<i>Composição química e classificação dos biomateriais</i>	20
1.2	Resposta biológica a biomaterias	22
1.2.1	<i>Biocompatibilidade</i>	22
1.2.2	<i>Osteogênese</i>	23
1.2.3	<i>Osseointegração</i>	26
1.3	Infecções em implantes	29
1.4	Propriedades e Características do Titânio	31
1.5	Métodos de modificação de superfícies em biomateriais para implantes ósseos	34
1.5.1	<i>Anodização e Nanotubos de TiO₂</i>	36
1.5.2	<i>Dip coating e spin coating</i>	38
1.5.3	<i>Técnica de auto-montagem Layer by Layer</i>	40
1.5.4	<i>Recobrimento com Prata</i>	42
1.6	Lectinas como agentes funcionalizantes de nanotubos de TiO₂	44
1.6.2	<i>Lectina do veneno de Bothrops leucurus (BL)</i>	46
2	JUSTIFICATIVA	47
3	OBJETIVOS	48
3.1	Objetivo Geral	48
3.2	Objetivos específicos	48
4	METODOLOGIA	49
4.1	Síntese das amostras	49
4.1.1	<i>Revestimento da matriz nanotubular de TiO₂ com nanopartículas de prata</i>	49

4.1.2	<i>Revestimento da matriz nanotubular de TiO₂ com lectina de Bothropus leucurus</i>	50
4.2	Caracterização das amostras	50
4.2.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV)</i>	51
4.2.2	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	51
4.2.3	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	51
4.2.4	<i>Medidas Eletroquímicas</i>	51
4.3	Avaliação da Biocompatibilidade	52
4.3.1	<i>Cultivo das células de osteosarcoma humano.</i>	52
4.3.2	<i>Avaliação da citotoxicidade da lectina BIL</i>	52
4.3.3	<i>Teste de Adesão</i>	53
4.3.4	<i>Avaliação Morfológica</i>	53
4.3.5	<i>Análise da Viabilidade Celular</i>	54
4.3.6	<i>Avaliação do Potencial Osteogênico</i>	54
4.4	Investigação da Atividade Bactericida	55
4.5	Análises Estatísticas	55
5	RESULTADOS	56
5.1	Padronização das amostras revestidas com Ag	56
5.2	Padronização das amostras revestidas com BIL	60
5.3	Síntese e Caracterização das superfícies modificadas de TiO₂ pós-padronização	61
5.4	Avaliação da Biocompatibilidade	71
5.4.1	<i>Avaliação da adesão celular</i>	72
5.4.2	<i>Avaliação da morfológica das células</i>	75
5.4.3	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	76
5.4.4	<i>Avaliação do potencial osteogênico</i>	77
5.5	Atividade Bactericida	78

6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXO A - ARTIGO COMO AUTOR PRINCIPAL ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA <i>BIOMOLECULES</i>	99
	ANEXO B - ARTIGO COMO COAUTOR PUBLICADO NA JOURNAL OF DRUG DELIVERY AND TECHNOLOGY	100

1 REFERENCIAL TEÓRICO-CONCEITUAL

A necessidade de se reestabelecer funções perdidas de órgãos e tecidos afetados por alguma doença ou trauma vêm contribuindo para grandes avanços na medicina regenerativa, através da busca por estratégias inovadoras para o desenvolvimento de novos materiais e tecnologias. Este avanço tem tornado possível aumentar a expectativa e qualidade de vida dos beneficiários de terapias envolvendo algum tipo de aparato biomédico.

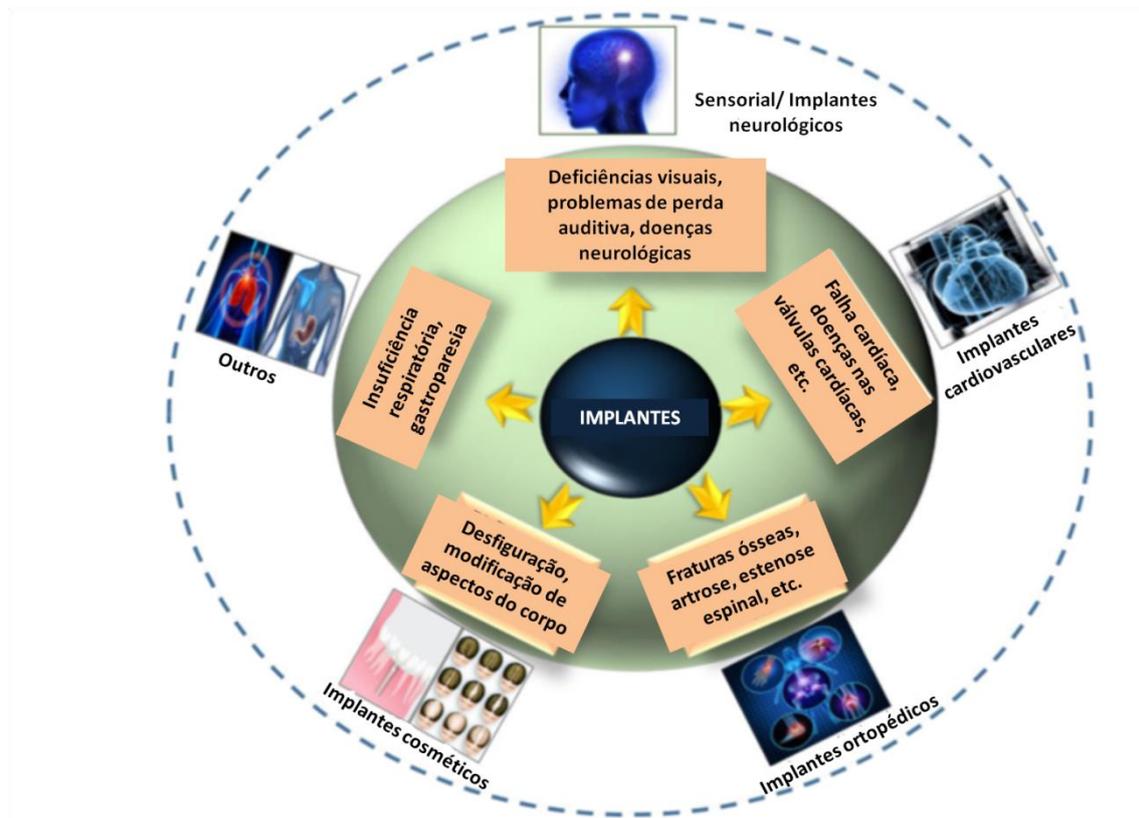
1.1 Biomateriais

Os biomateriais compreendem uma representativa fração dos produtos utilizados na área de saúde. De acordo com o *The National Institutes of Health Consensus* de 1982, um biomaterial pode ser definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, usada por qualquer período, como um todo ou uma parte de um sistema, no intuito de tratar, aumentar ou substituir quaisquer tecidos, órgão ou função do corpo (SMITH et al., 2015). No entanto, ao longo do tempo e com os avanços biotecnológicos uma nova definição incluiu o termo “funcionalidade adequada” aos biomateriais, considerando que qualquer material, para ser considerado como biomaterial não apenas deve servir de suporte aos tecidos e órgãos, mas também deve realizar uma determinada função no organismo (ARJUNAN et al., 2020). Dentre eles, podem ser citados os dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis ou bioimplantes (como suturas, placas, substitutos ósseos, válvulas cardíacas, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele), curativos, dentre muitos outros (PIRES et al., 2015).

Os bioimplantes caracterizam-se por serem biomateriais introduzidos cirurgicamente para substituir, apoiar ou melhorar a função de qualquer órgão do corpo. Estes dispositivos têm sido uma solução promissora para o tratamento de desordens neurológicas, deficiências visuais, doenças cardiovasculares, problemas ortopédicos, distúrbios dentários e outras condições. O mercado de bioimplantes vem crescendo exponencialmente devido ao aumento da população idosa, mudanças no estilo de vida (especialmente aquelas que promovem doenças crônicas como artrose e doenças cardiovasculares), às melhorias tecnológicas - que possibilitam o tratamento de doenças anteriormente vistas como não tratáveis - e da conscientização sobre implantes cosméticos (KUMAR et al., 2020) (Figura 1). No Brasil, por exemplo, somente o

mercado de implantes dentários movimentou cerca de R\$ 590 milhões no ano de 2019 (PORTAL SAÚDE BUSINESS, 2019). Estima-se que o mercado global de bioimplantes, tenha alcançado US\$ 115,8 bilhões em 2020, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR, *compound annual growth rate*) de 10,3% durante o período estimado (2014-2020) (KAUL; JAISWAL, 2020).

Figura 1 – Diagrama com diversas aplicações dos bioimplantes



Fonte: Adaptado de Kumar et al. (2020).

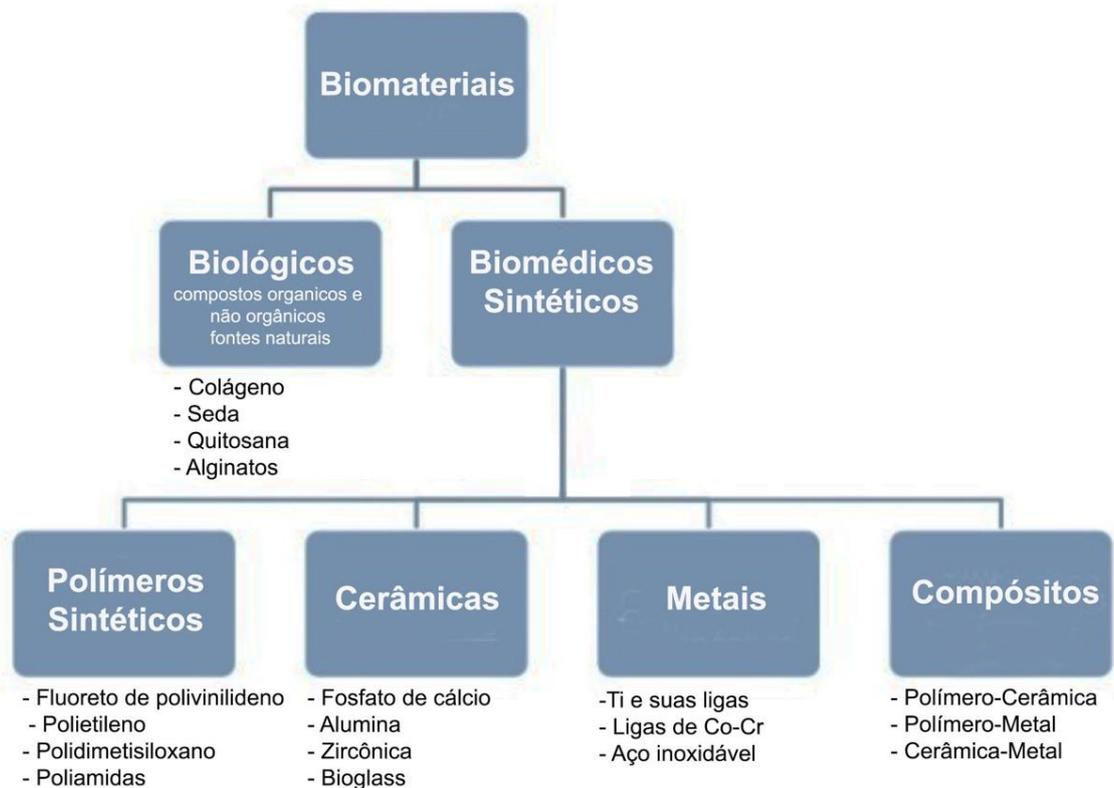
Os materiais utilizados na fabricação de implantes devem exibir propriedades que não se alteram em longo prazo, mesmo estando em contato com diferentes fluidos biológicos. Também são essenciais as propriedades mecânicas, como resistência à tração, dureza, elasticidade, densidade, resistência ao desgaste e molhabilidade. Estas propriedades dependem da função que o implante terá no organismo. Por exemplo, um material usado para reconstrução de vasos deve ter alta flexibilidade, enquanto para a confecção de próteses de quadril, os materiais devem ter força mecânica e alta resistência à corrosão (KIRADZHIYSKA; MANTCHEVA, 2019).

1.1.1 Composição química e classificação dos biomateriais

De acordo com sua natureza química, os biomateriais podem ser classificados em biológicos/naturais e biomédicos sintéticos (Figura 2). Os de origem natural, incluem os materiais à base de proteínas, tais como colágeno e gelatina, polissacarídeos, como por exemplo, celulose e quitina/quitosana; e ainda derivados de tecidos descelularizados, oriundos de vasos sanguíneos e fígado (HA et al., 2013). Estes biomateriais representam uma classe de substâncias que usualmente são a primeira escolha quando se trata de eleger um biomaterial funcional e eficiente. Isto é particularmente importante quando se considera aqueles que mimetizam uma função biológica ou mecânica da matriz extracelular encontrada nos tecidos, como por exemplo o colágeno e a fibrina (BROVOLD et al., 2020).

Biomateriais sintéticos podem ser subdivididos em polímeros, cerâmicas, compósitos e metálicos. (VALLET-REGÍ, 2001).

Figura 2 – Classificação dos biomateriais



Fonte: A autora.

Os polímeros sintéticos podem ser usados em suturas reabsorvíveis, válvulas cardíacas e como transportador para entrega de medicamentos. Existe uma grande diversidade com

aplicações médicas comprovadas como, por exemplo, suturas reabsorvíveis feitas de policaprolactona e o metacrilato de polimetil que pode ser utilizado como componente principal do cimento ósseo. Uma grande vantagem desses materiais é o fato de que a presença de uma solução fisiológica isotônica, extremamente hostil aos implantes médicos, tem pouco efeito sobre os componentes dos materiais poliméricos. No entanto, a baixa solidez, elasticidade excessiva e risco de fadiga acabam restringindo seu uso em alguns campos de aplicação (KIRADZHIYSKA; MANTCHEVA, 2019). Outra preocupação com relação aos polímeros sintéticos é o aparecimento de reações adversas como toxicidade devido aos grupamentos utilizados na formação do polímero (glutaraldeído, por exemplo) ou seus grupamentos reativos (aldeídos, amidas, hidrazidas, etc.) (KOHANE; LANGER, 2008).

Os materiais cerâmicos, são normalmente definidos como compostos inorgânicos de origem não metálica (HUANG et al., 2014). Estes materiais possuem fortes ligações interatômicas que formam estruturas com elevado grau de compactação, tornando-os duros, mas muito suscetíveis a fraturas. Devido a estes fatores, as cerâmicas são pouco indicadas para regiões submetidas a tensões elevadas e que requeiram sustentação. Por outro lado, são bastante utilizadas na fabricação de dispositivos para a reconstrução odontológica, preenchimentos ósseos e próteses ortopédicas. Exemplos materiais cerâmicos incluem a alumina, hidroxiapatita e o gesso (PIRES et al., 2015).

Os compósitos, por sua vez, são caracterizados por conter pelo menos dois materiais, de natureza diferente, trabalhando juntos e formando o design do implante. Todos os materiais possuem características próprias e combiná-los pode levar a uma diminuição das desvantagens como fragilidade, lixiviação de íons nos tecidos circundantes, baixa biocompatibilidade, reabsorção óssea etc. (SCHOLZ, et al., 2011). A formação dos biomateriais compósitos pode se dar de diversas formas, sendo as principais associações as do tipo polímero-cerâmica e metal-cerâmica. Suas vantagens estão ligadas à capacidade de melhorar a adesão celular e a fixação óssea direta, no caso dos implantes. De forma geral, os compósitos apresentam grande potencial para aplicação como biomateriais e estão em crescente estudo e desenvolvimento, devido à possibilidade de ajustes entre os desempenhos mecânico e biológico, para diversas situações clínicas específicas (TANG et al., 2021).

Entre os diferentes tipos de matérias-primas disponíveis para a obtenção de biomateriais, a classe dos metais destaca-se por apresentar excelente desempenho mecânico, alta resistência à fadiga e à fratura. Devido a estas características, os metais têm sido amplamente utilizados como componentes estruturais visando à substituição, reforço ou estabilização de tecidos rígidos, os quais são constantemente submetidos a altas cargas de tração e compressão. Neste

âmbito, as aplicações mais comuns incluem fios, parafusos e placas para fixação de fraturas, implantes dentários e próteses para substituição de articulações. Para que possam ser aplicados com segurança no corpo humano, os metais e suas ligas devem cumprir uma série de requisitos. Prioritariamente, devem ser biocompatíveis, de forma a não produzir reações inflamatórias, tóxicas ou alérgicas. Devem ainda, ser quimicamente estáveis e apresentar apropriada resistência à corrosão, a fim de prevenir a degradação no ambiente biológico. No caso de implantes ósseos, uma alta força de adesão entre os osteoblastos e o implante é requerida. Propriedades mecânicas adequadas, como módulo de elasticidade similar ao do osso humano e resistência à fadiga, também devem ser consideradas (YANG et al., 2017).

Alguns metais comumente utilizados na fabricação de biomateriais metálicos incluem vanádio, ferro, cromo, cobalto, níquel, tântalo, nióbio, molibdênio e tungstênio. Nesta classe, o titânio (Ti) se destaca por possuir excelente biocompatibilidade devido principalmente à camada de óxido estável formada em sua superfície. Este metal e suas ligas tem sido o material de escolha na fabricação de implantes ósseos e dentários (SAINI et al., 2015). Ainda que sejam extremamente úteis como biomateriais nas mais diversas aplicações, os metais e suas ligas, podem levar um aumento na incidência de complicações relacionadas a uso de implantes, como a sua ineficiente integração aos tecidos, indução de resposta inflamatória, instabilidade mecânica, necrose e infecções associadas. O uso destes biomateriais também pode aumentar o tempo de cuidados ao paciente, causar dor e perda da função do implante (PRASAD et al., 2017; ASHTIANI et al., 2021).

1.2 Resposta biológica a biomateriais

Quando biomateriais são introduzidos em um organismo eles assumem papel fundamental em procedimentos terapêuticos que objetivam a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos. Neste contexto, a performance de um biomaterial é dependente da biocompatibilidade do material usado, da sua funcionalidade e a segurança biológica do sistema como um todo (ASHITIANI et al., 2021; WILLIAMS, 2020).

1.2.1 Biocompatibilidade

No caso dos implantes, estes devem ter a capacidade de osseointegração (WILLIAMS, 2020). A biofuncionalidade é a capacidade do biomaterial desempenhar a função desejada. Já a biocompatibilidade é a aceitação do implante pelo organismo, seja em regiões próximas ou

órgãos distantes. Para ilustrar este conceito, podemos dizer que um biomaterial ideal para regeneração do tecido cardíaco, por exemplo, deve ter uma influência positiva sobre as propriedades biomecânicas e bioquímica dos tecidos e células; refletir a morfologia e funcionalidade do miocárdio, ser mecanicamente estável e ter a espessura adequada (TROMBINO et al., 2021). É importante, no entanto, que se faça uma distinção entre a biocompatibilidade e toxicidade de um determinado biomaterial. Enquanto a biocompatibilidade se refere a habilidade de um biomaterial de realizar uma função, sem disparar nenhum efeito indesejável local ou sistêmico ao beneficiário da terapia, a toxicidade diz respeito a habilidade do biomaterial afetar a fisiologia ou interromper o funcionamento normal de órgãos e tecidos. Desta forma, a toxicidade depende das características físico-químicas dos biomateriais, tais como forma, tamanho, carga e composição química (LI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012). Por outro lado, a biocompatibilidade não é uma propriedade intrínseca de um material, mas sim do ambiente biológico onde este biomaterial foi inserido. Por exemplo, uma formulação que é biocompatível por via subcutânea pode não ser por outras vias de administração (KOHANE et al., 2010). Neste contexto, nem todo material desprovido de toxicidade pode apresentar uma boa biocompatibilidade. Por outro lado, para garantia de uma biocompatibilidade adequada, os materiais devem apresentar elementos não tóxicos (COELHO, 2013).

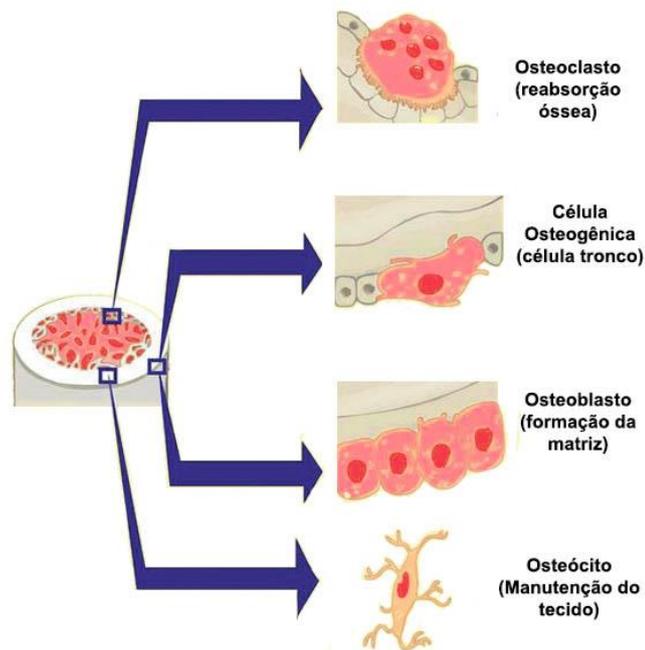
1.2.2 Osteogênese

O tecido ósseo representa um tecido conjuntivo altamente especializado, constituído por células metabolicamente ativas imersas em uma matriz extracelular mineralizada. Esta última é vital para performance estrutural, mecânica e metabólica deste tecido (LATTANZI; BERNARDINI et al., 2012). Sob o ponto de vista de seu desenvolvimento, a formação do osso pode ser dividida em 2 processos: O primeiro é a ossificação intramembranosa, no qual o osso se forma diretamente do tecido conjuntivo mesenquimal. O segundo é a ossificação endocondral, no qual tecido ósseo substitui uma cartilagem hialina pré-existente. Qualquer que seja o tipo de formação do tecido ósseo, sua fisiologia é altamente dependente de fatores de crescimento e outros hormônios tais como a vitamina D, hormônio da paratireoide (PTH) e calcitonina. A perfeita mineralização óssea é suportada por vários tipos celulares, os quais podem ter sua função alterada por fatores genéticos, mudanças hormonais, idade e patologias (CHANDRA et al., 2021).

Quatro tipos de células podem ser encontrados no osso: osteoblastos, células osteogênicas, osteoclastos e osteócitos. Os três primeiros estão presentes na superfície dos ossos e são

derivados de células progenitoras locais. Já os osteócitos permeiam o interior do osso e são produzidos pela fusão de células precursoras (SALHOTRA et al., 2020) (Figura 3). Independente do tipo de ossificação, os osteoblastos figuram como peça-chave na produção e posterior mineralização da matriz óssea. Estas células também participam na regulação dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção e remodelamento do tecido ósseo. A função da matriz mineralizada é conferir força ao esqueleto, servindo de reservatório de minerais e fatores de crescimento (NAKASHIMA et al., 2003). Os osteócitos são os tipos mais abundantes do osso, constituindo 90–95% das células no tecido ósseo de um adulto. Eles são derivados de osteoblastos diferenciados e circundados por matriz não mineralizada (osteóide), durante o processo de formação óssea. Uma vez que o osteóide mineraliza, os osteócitos ficam presos na matriz e formam uma rede extensa uns com os outros, com os osteoblastos e com as células osteogênicas na superfície do osso. Estas células possuem o corpo pequeno e numerosas projeções que formam um sistema canicular. Os osteócitos desempenham papel importante na regulação dos osteoblastos e na diferenciação e função dos osteoclastos (INFANTE et al., 2018) (Figura 3).

Figura 3 – Tipos celulares do tecido ósseo

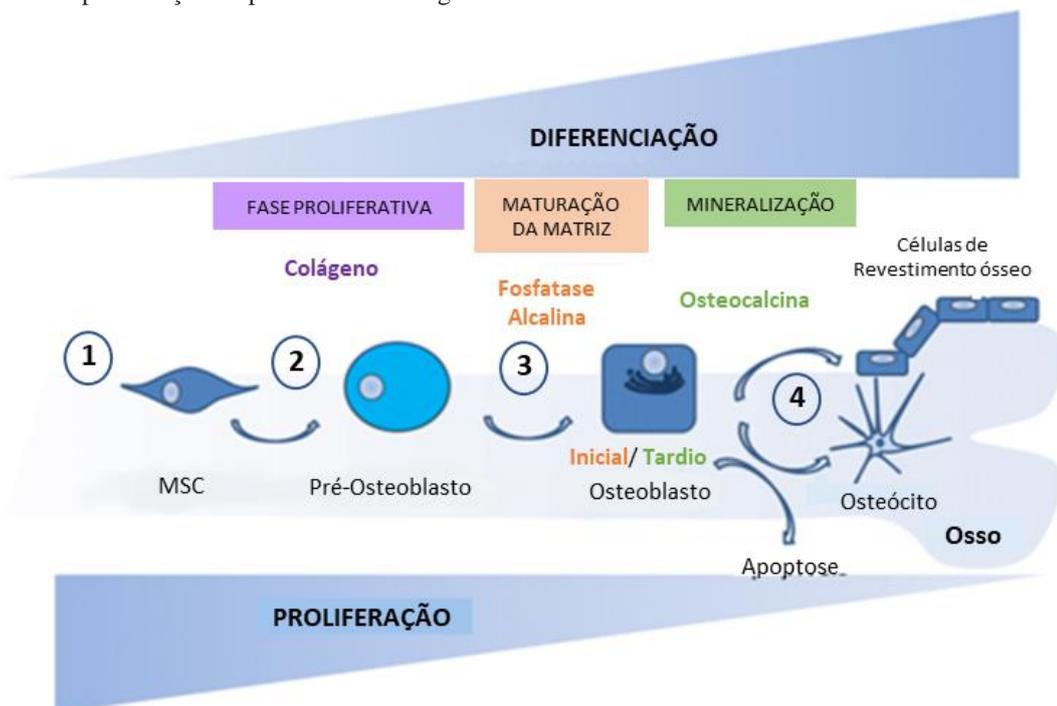


Fonte: Adaptado de Setiawati e Rahardjo (2012).

Durante o processo de osteogênese células mesenquimais fusiformes, aderentes e de origem não hematopoiética, são recrutadas dos centros de remodelagem óssea e subsequentemente se

diferenciam em pré-osteoblastos, os quais proliferam ativamente, mas não são ainda capazes de secretar matriz extracelular (INFANTE et al., 2018). Algumas destas células podem também se diferenciar em vasos capilares, fornecendo nutrientes e gases para a manutenção do tecido. Outras diferenciam-se em osteoblastos, os quais secretam uma matriz de colágeno-proteoglicana capaz de se ligar a cálcio. Uma vez que a matriz esteja formada, os osteoblastos poderão ter três destinos: se diferenciar em osteócitos embebidos na matriz mineralizada, perdendo a maior parte de suas organelas citoplasmáticas; entrar em processo de morte celular ou permanecem inativos e quiescentes. À medida que a calcificação progride, espículas ósseas começam a irradiar para fora da região onde a ossificação ocorre. Estas espículas são circundadas por células mesenquimais que formam o perióstio (membrana que circunda o osso). As células na superfície do perióstio também se tornam osteoblastos e depositam osteóide paralelamente às espículas existentes. Desta maneira, muitas camadas de osso são formadas (NAKASHIMA et al., 2003) (Figura 4).

Figura 4 - Representação do processo de osteogênese.



Fonte: Infante et al. (2018)

Legenda: (1) Células da linhagem mesenquimal ativas (2) Células mesenquimais diferenciam-se em pré-osteoblastos. (3) Os pré-osteoblastos se diferenciam em osteoblastos, diminuem a sua taxa de proliferação enquanto começam a expressar fosfatase alcalina, secretada pelos osteoblastos iniciais (fase de maturação da matriz) e osteocalcina secretada por osteoblastos mais tardios (fase de mineralização). (4) Uma vez que os osteoblastos tenham cumprido o seu papel na formação e mineralização da matriz eles podem se tornar células osteogênicas quiescentes, entrar em processo de apoptose, ou se diferenciar em osteócitos.

1.2.3 Osseointegração

O conceito de osseointegração, foi definido 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, que definiu osseointegração como sendo 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). Posteriormente, este mesmo grupo, propôs a definição de osseointegração como sendo uma reação ao corpo estranho, na qual o osso interfacial é formado como uma reação de defesa para proteger o implante (ALBREKTSSON et al., 2017). Visto que uma das principais causas de perda de implante são as infecções bacterianas, um outro conceito em relação a osseointegração é de que ela passa a ser uma competição entre organismos infecciosos que procuram naturalmente contaminar, colonizar e finalmente formar um biofilme na superfície do biomaterial, versus a capacidade ou mesmo rapidez dos tecidos endógenos de crescer sobre o implante via osteogênese (KLIGMAN et al., 2021).

Os mecanismos celulares que ocorrem na interface osso-implante durante a osteogênese ainda são pouco conhecidos. No caso dos implantes de titânio, a primeira resposta após a sua aplicação é o umedecimento, seguido por uma rápida adsorção de proteínas em sua superfície. Geralmente, as primeiras proteínas adsorvidas na interface sólido-líquido *in vivo* derivam do sangue. Esta capacidade de adsorção dependerá de características físico-químicas da superfície do implante, como hidrofobicidade ou energia superficial, e do meio local (pH, temperatura, concentração de íons, composição e grupos funcionais das proteínas, força de solução etc.) (JÄGER et al., 2017). As diferentes interações entre as superfícies de titânio e seu microambiente *in vivo*, podem ser divididos nas seguintes fases (Figura 5):

Fase I: Adsorção de moléculas de baixo e alto peso molecular. A carga positiva do titânio é responsável por uma ligação inicial de pequenas moléculas carregadas negativamente, seguida por grupos funcionalizados carregados de moléculas de alto peso molecular. Neste estágio dinâmico, proteínas locais (como fibronectina, albumina, fibrinogênio, IgG e proteínas do sistema complemento) estão ativamente envolvidas, enquanto os lipídios desempenham um papel secundário. Com o tempo, moléculas com maior afinidade pela superfície, mas com taxas de difusão mais lentas substituem as menores, caracterizando o “efeito de Vroman” (VROMAN, 1987). Este fenômeno está associado com a mudança conformacional das proteínas alterando as características iniciais da superfície do implante de titânio (JÄGER et al.,

2017). A adsorção de proteínas é um processo que ocorre em questão de segundos após o contato do biomaterial com os tecidos. Ainda nesta fase, se dá a adesão de plaquetas e liberação de seus componentes levando à formação de uma rede de fibrina, envolvida na adesão celular (BAKIR et al., 2012).

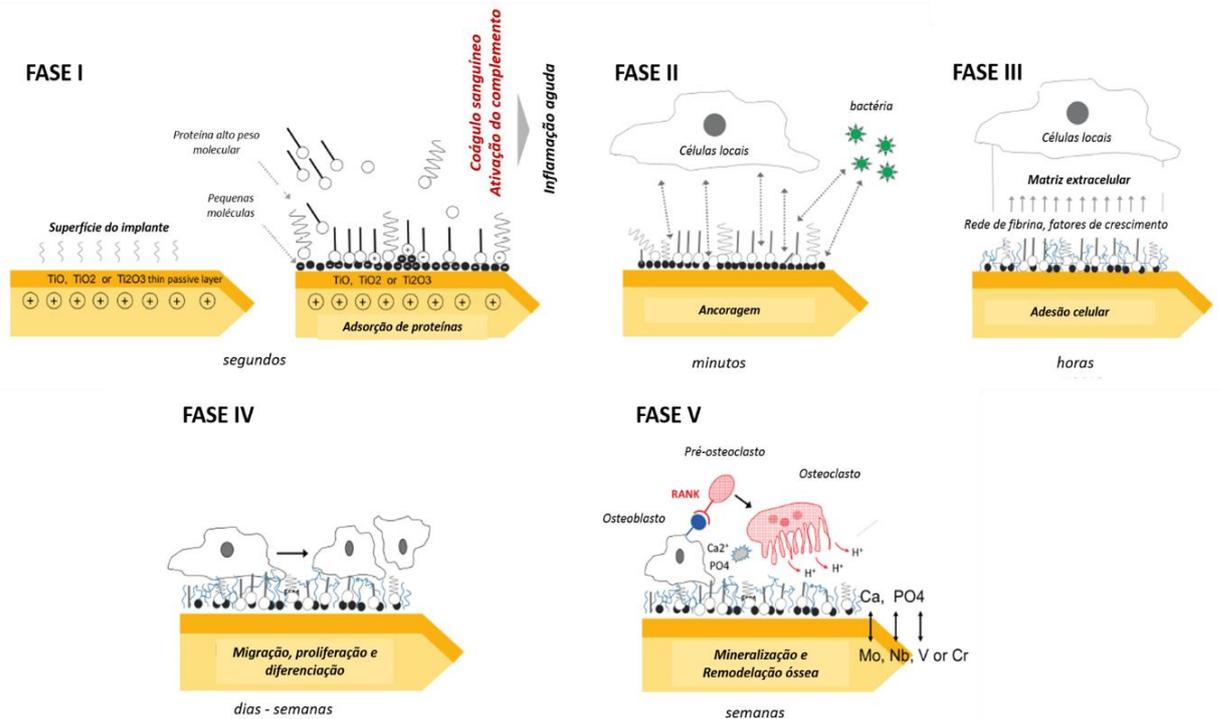
Fase II: Uma vez que o biomaterial é revestido com esta monocamada, diferentes tipos de células se ligam rapidamente a sua superfície. Nesse estágio, é crucial que células se liguem ao filme de proteína antes das bactérias garantindo o sucesso do implante (GITTENS et al., 2014).

Fase III: À fixação celular inicial segue uma fase de adesão, dominada por interações das proteínas da matriz extracelular (MEC) com as células adjacentes, através das sequências Arg-Gly-Asp (RGD) das proteínas fibronectina e vitronectina. Estas proteínas de ancoragem desempenham um papel crucial nos estímulos quimiotáticos e adesivos da biomineralização e maturação da matriz. Além das células mesenquimais, neutrófilos e macrófagos colonizam o implante, levando ao processo de recobrimento do corpo estranho e liberação de citocinas e fatores de crescimento, incluindo a proteína morfogenética 2 (BMP-2), para atrair fibroblastos e osteoblastos. Esta fase também é acompanhada por mudanças quantitativa e qualitativa da camada de proteína entre a célula e a superfície do titânio.

Fase IV: A migração, proliferação e diferenciação de células osteogênicas seguem nesta fase. Os principais responsáveis pela osseointegração final do biomaterial de titânio e pela formação óssea são os osteoblastos. Nesta etapa, é evidente que grande parte do ambiente natural ao redor dos osteoblastos e osteoclastos consiste em estruturas com topografia em nanoescala, que tentam recapitular o ambiente fisiológico do osso em crescimento. Isso resulta em aumento da disseminação de osteoblastos e extensão filopodial (JÄGER et al., 2017).

Fase V: Finalmente, mudanças locais do pH e acúmulo de cálcio (Ca) e fosfato (PO_4) levam à biomineralização e osseointegração ao implante de titânio. No entanto, sob condições patológicas, a adsorção de proteínas pode ser reversível, especialmente se o valor do pH local diminuir, como na inflamação (DELCROIX et al., 2015). Além dos osteoblastos, o remodelamento ósseo é mediado principalmente pelos osteoclastos, que reabsorvem o osso recém-formado para resolver as microfraturas. A remodelação do osso em contato com a superfície do implante continua ao longo da vida útil do biomaterial (KUZYK et al., 2011).

Figura 5 – Processo de osseointegração em superfícies de titânio após aplicação *in vivo*.



Fonte: Adaptado de Jager et al (2017).

O ponto chave do processo de osseointegração está no contato direto entre a superfície do implante e o tecido ósseo. Assim, a resposta local está intimamente ligada às propriedades físico-químicas superficiais dos materiais utilizados em implantes. Pesquisas indicam que o desenvolvimento de superfícies texturizadas pode aumentar a eficiência do processo, influenciando diretamente a interface osso/implante, e aumentando a qualidade da formação do tecido ósseo formado (HAYASAKI; SOUSA, 2006).

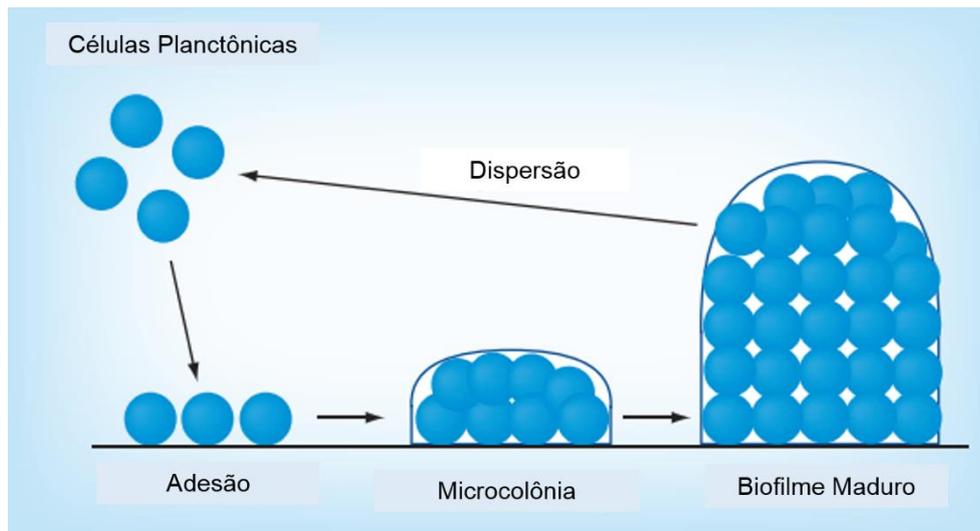
Sabe-se que o tecido ósseo é composto por duas fases principais, a matriz orgânica, conferindo ao osso certa flexibilidade diante de tensões, e a matriz inorgânica, formada pelo mineral hidroxiapatita (HA). Este composto confere ao osso uma maior rigidez e capacidade de suportar grandes compressões. Estas propriedades mecânicas do sistema osso/implante dependem da rugosidade e da porosidade da superfície do material para favorecer o crescimento ósseo. Diante disso o processo de anodização, por exemplo, faz com que o implante de titânio, se assemelhe com a parte inorgânica do tecido ósseo (FERREIRA, 2019).

1.3 Infecções em implantes

A infecção bacteriana é uma das principais causas de falha dos implantes. Apesar dos avanços na qualidade da assistência médica, a probabilidade de ocorrer infecção durante um procedimento cirúrgico ainda é alta. Os biomateriais ortopédicos, por exemplo, são utilizados em grandes volumes e fazem das infecções hospitalares uma prioridade de saúde pública nos países desenvolvidos. Atualmente, o risco global de infecção em uma cirurgia ortopédica é de 2-5% (CHOUIRFA et al., 2019). Durante o curso da cirurgia, os implantes são suscetíveis à contaminação por bactérias da pele e das mucosas (BROGGINI et al., 2006). Essas infecções associadas ao dispositivo podem progredir rapidamente à medida que as bactérias planctônicas aderem na superfície do implante e, evoluem para biofilmes (WANG et al., 2011).

Um biofilme pode ser definido como uma comunidade de diferentes microrganismos protegidos por uma matriz polissacarídica autoproduzida, e que são irreversivelmente ligados à uma superfície (ARCIOLA et al., 2012; LINDSAY; VON HOLY, 2006). Um biofilme protege as bactérias organizadas do estresse de cisalhamento de fluidos e da ação de terapias farmacológicas sistêmicas. Além disso, o biofilme atua como uma instalação de armazenamento de nutrientes e substâncias (LINDSAY; VON HOLY, 2006).

A formação e o desenvolvimento de biofilmes podem ser divididos em uma sequência de eventos (Figura 6). (1) Ocorre uma primeira fixação reversível de bactérias à superfície sólida, principalmente devido ao movimento browniano celular e interações micróbio-superfície. Nesta fase, a rugosidade e a topografia da superfície têm uma grande influência e é determinante para o destino do implante.; (2) Acúmulo de bactérias e fixação irreversível, mediados por interações moleculares e celulares específicas (proteínas de adesão, apêndices proteicos e produção de EPS); (3) Maturação do biofilme, a formação de microcolônias bacterianas com o aprisionamento de células planctônicas no exopolissacarídeo (EPS); (4) Desprendimento de algumas bactérias para a colonização de novas superfícies

Figura 6– Processo de formação do biofilme

Fonte: Adaptado de Rabin et al (2015).

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é responsável pelas infecções das feridas cirúrgicas e, juntamente com o *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), causam infecções associadas aos dispositivos biomédicos (GOMES et al., 2013). A colonização e formação de biofilme bacteriano em implantes representam um desafio médico e cirúrgico pela destruição do tecido adjacente, levando à má vascularização, afrouxamento, descolamento ou mesmo luxações (CAMPOCCIA et al., 2006). Além disso, quando um biofilme maduro se desenvolve em qualquer superfície do implante, a erradicação bacteriana se torna bastante complicada, pela baixa penetração de antibióticos na matriz polissacarídica do biofilme, a escassa vascularização e possibilidade da presença de colônias resistentes. Estes fatores são responsáveis pela necessidade de remoção do dispositivo, visto que procedimentos de irrigação e desbridamento também falham em curar infecções relacionadas aos bioimplantes.

O surgimento de cepas resistentes representa um problema adicional sempre que antibióticos são administrados. Até o momento, nenhum tratamento pode garantir a destruição rápida e completa do biofilme ou impedir a recorrência da infecção. Portanto, o sucesso clínico em longo prazo depende das propriedades antimicrobianas dos materiais implantados. Neste sentido, numerosas macromoléculas com propriedade bactericida, peptídeos antimicrobianos, elementos metálicos (prata, cobre, zinco) e diversos antibióticos têm sido utilizados na engenharia dos biomateriais com o intuito de reduzir o risco de infecção na interface dos implantes (CHOUIRFA et al., 2019).

1.4 Propriedades e Características do Titânio

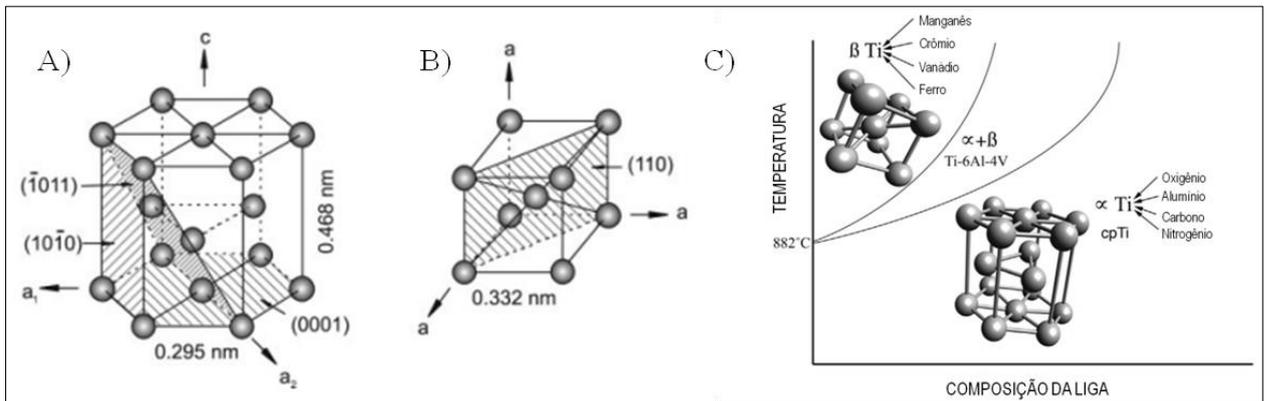
Atualmente, o titânio puro comercialmente (Ti-cp) e suas ligas são amplamente utilizados na fabricação de implantes ortopédicos e odontológicos devido à suas propriedades mecânicas e físicas superiores, como resistência à corrosão, alta tensão de elasticidade e sua excelente compatibilidade biomecânica (KIRMANIDOU et al., 2016).

O titânio está entre os dez elementos mais abundantes da crosta terrestre, não sendo encontrado puro na natureza, mas associado a minerais como TiO_2 , sob a forma de Rutilo e Iemenita. Quando em temperaturas abaixo de $882^\circ C$ 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 5A-B). A manipulação destas características cristalográficas por adição de ligantes e processos termomecânicos permite a obtenção de ligas com as mais variadas propriedades (CALLISTER, 2009).

O Ti-cp é classificado em quatro graus de pureza de acordo com a porcentagem composição de elementos como nitrogênio, oxigênio e ferro em sua composição, sendo que as quantidades desses elementos influenciam na dureza, na resistência mecânica e na resistência a corrosão (HARADA et al., 2016). O Ti puro grau 1, quando comparado ao Ti puro grau 4, apresenta uma quantidade menor de oxigênio e conseqüentemente uma maior resistência à corrosão, porém o Ti grau 4 possui maior resistência mecânica. Já o Ti puro grau 2 é o mais utilizado na área médica, especificamente em aplicações odontológicas, por ser mais resistente mecanicamente que o Ti grau 1 e possuir semelhante resistência à corrosão (DAVIS, 2003).

Através da ligação seletiva com outros elementos é possível criar ligas de titânio com fase α , fase β ou fase α - β estável. Elementos como alumínio, carbono, oxigênio e nitrogênio estabilizam a fase α do titânio e elementos como manganês, cromo, ferro e vanádio estabilizam a fase β . O Ti-cp é um cristal monofásico (α) à temperatura corporal, enquanto titânio – 6alumínio – 4vanádio (Ti-6Al-4V) é uma liga de fase α - β (PRASAD, et al., 2015) (Figura 7C). As propriedades mecânicas finais das ligas dependem também do histórico de tratamento incluindo anelamento, tratamento térmico e solução utilizada, os quais alterarão a microestrutura e a composição de fases. (SHAH, 2016).

Figura 7 – Estrutura cristalina do titânio.



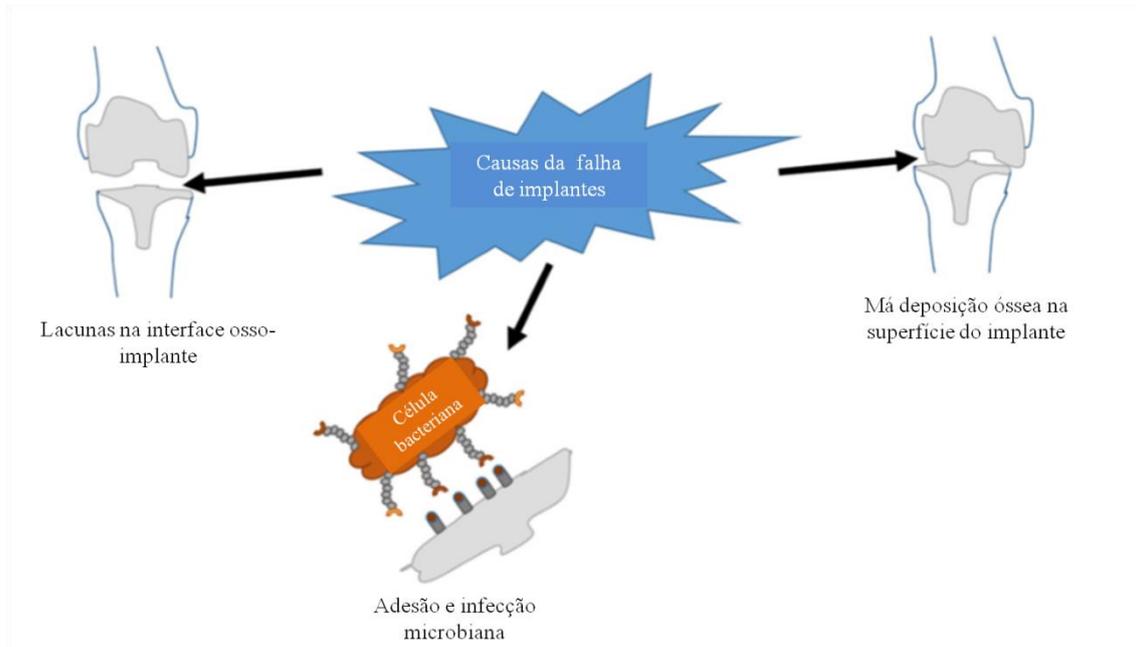
Fonte: Adaptado de Leyens; Peters (2003) e Prasad et al (2015).

Legenda: (A) Forma hexagonal compacta, α ; (B) Forma cúbica de corpo centrado, β ; (C) Elementos que estabilizam as fases α , β e α - β .

Atualmente, o Ti-cp e Ti-6Al-4V são os materiais mais utilizados em implantes na área odontológica e cirurgias reconstrutivas ortopédicas, incluindo dispositivos de fixação (placas e parafusos) para coluna vertebral, quadril e joelho. Estes bioimplantes são bem tolerados pela maioria dos pacientes e têm uma capacidade superior de integração ao osso. Sabe-se que uma das principais razões para as excelentes propriedades físicas e biológicas do titânio e de suas ligas é a camada de dióxido de óxido (TiO_2), criada espontaneamente em sua superfície após exposição ao ar. Essa camada, com apenas alguns nanômetros de espessura ($4,3 \pm 0,2$ nm), parece ser responsável pela estabilidade química, inércia química, resistência à corrosão e pela biocompatibilidade de titânio (DONACHIE, 2000; KIRMANIDOU et al., 2016).

Inquestionavelmente, muito progresso foi feito ao longo dos anos e as taxas de sobrevivência de implantes dentários e ortopédicos são bastante satisfatórias. Apesar disso, estudos apontam que falhas podem ocorrer devido às infecções, fraturas, desgaste das superfícies e afrouxamento na interface tecido-implante, como representado na figura 8.

Figura 8 – Principais causas das falhas em implantes ortopédicos.



Fonte: Adaptado de Kumar et al. (2020).

Uma vez implantados, os biomateriais permanecem em contato com o fluido corpóreo que contém oxigênio dissolvido, proteínas e vários íons, como cloreto e hidróxidos (PARK; BRONZINO, 2002). No caso de implantes dentários, as ligas metálicas estão ainda suscetíveis às variações de temperatura e pH, presença de biofilme microbiano e propriedades físico-químicas dos alimentos. Todos estes meios podem ser agressivos aos metais, provocando a sua corrosão. Adicionalmente a estes fatores, grande parte dos implantes trabalha sob a ação de cargas mecânicas que geram atrito, deslizamento e, conseqüentemente, a possível liberação de partículas metálicas. Como resultado destes mecanismos de desgaste e corrosão, a integridade mecânica e estrutural do implante pode ser comprometida, levando à sua falha prematura ou à fratura. Além disso, os produtos da degradação dos implantes têm sido associados a complicações como osteólise, inflamações, reações alérgicas e vasculites, podendo ainda ocasionar o acúmulo de íons metálicos em órgãos, teratogenicidade e câncer (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). A liberação de partículas de alumínio e vanádio das ligas Ti-6Al-4V, vêm sendo apontada como tóxica, mutagênica e causadora de doenças como osteomalácia, Alzheimer e outros distúrbios (CATALANI et al., 2013; KEEGAN et al., 2007).

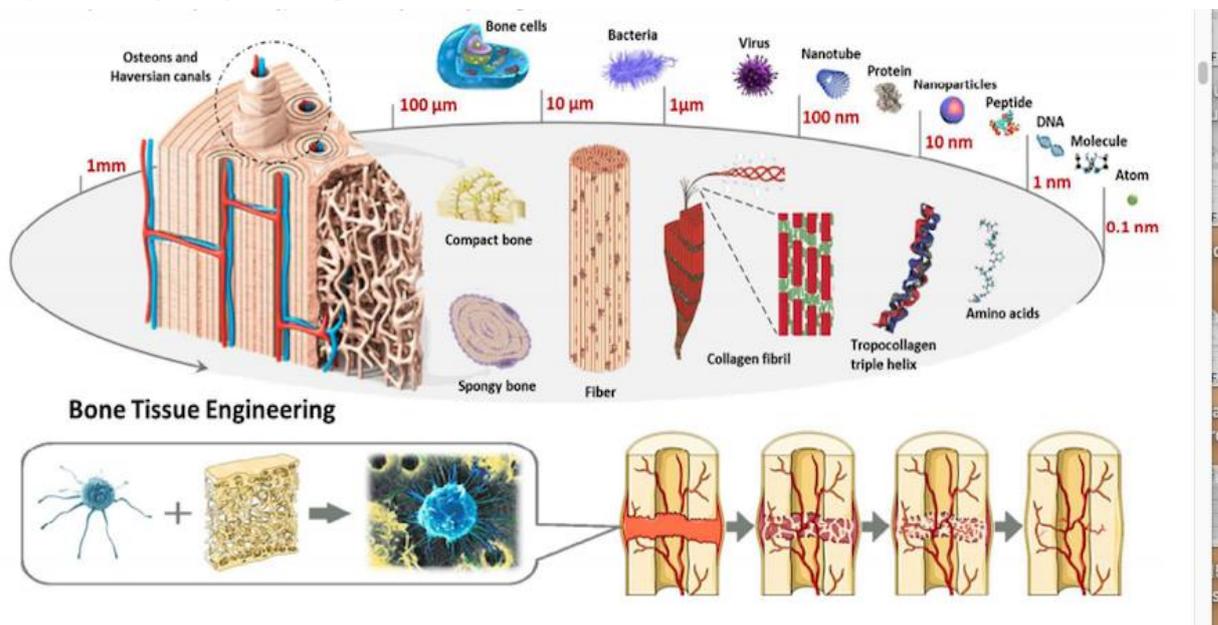
Conseqüentemente, ainda são necessárias novas ligas de Ti e tratamentos de superfície capazes de: (I) Aumentar a resistência à corrosão; (II) Melhorar a biocompatibilidade, sem reações de citotoxicidade, a fim de evitar falhas biológicas; (III) Superfícies mais bioativas que

levarão a uma melhor e mais rápida integração; (IV) Aumento das propriedades antimicrobianas que reduzirão as falhas na infecção (KIRMANIDOU et al., 2016).

1.5 Métodos de modificação de superfícies em biomateriais para implantes ósseos

Como visto anteriormente, o osso é um tecido estruturalmente complexo e multifuncional, capaz de se remodelar para obter o máximo de dureza e suportar estresse mecânico ao qual é constantemente submetido. Parte de suas propriedades mecânicas e biológicas se deve a forma como o osso está organizado de forma hierárquica em uma escala micro e nanométrica (Figura 9). Na escala nanométrica o osso age como um arcabouço para a regulação celular, e, portanto, é nesta superfície nanoestruturada que os eventos de osseointegração e cicatrização ocorrem. Assim no desenvolvimento de implantes ideais, é importante que o biomaterial utilizado simule a característica hierárquica de forma a mimetizar o ambiente onde as células do tecido interagem e desempenham suas funções (HAO et al., 2017; ZHU et al., 2020).

Figura 9 – Organização hierárquica do tecido ósseo em macro e nanoescala.

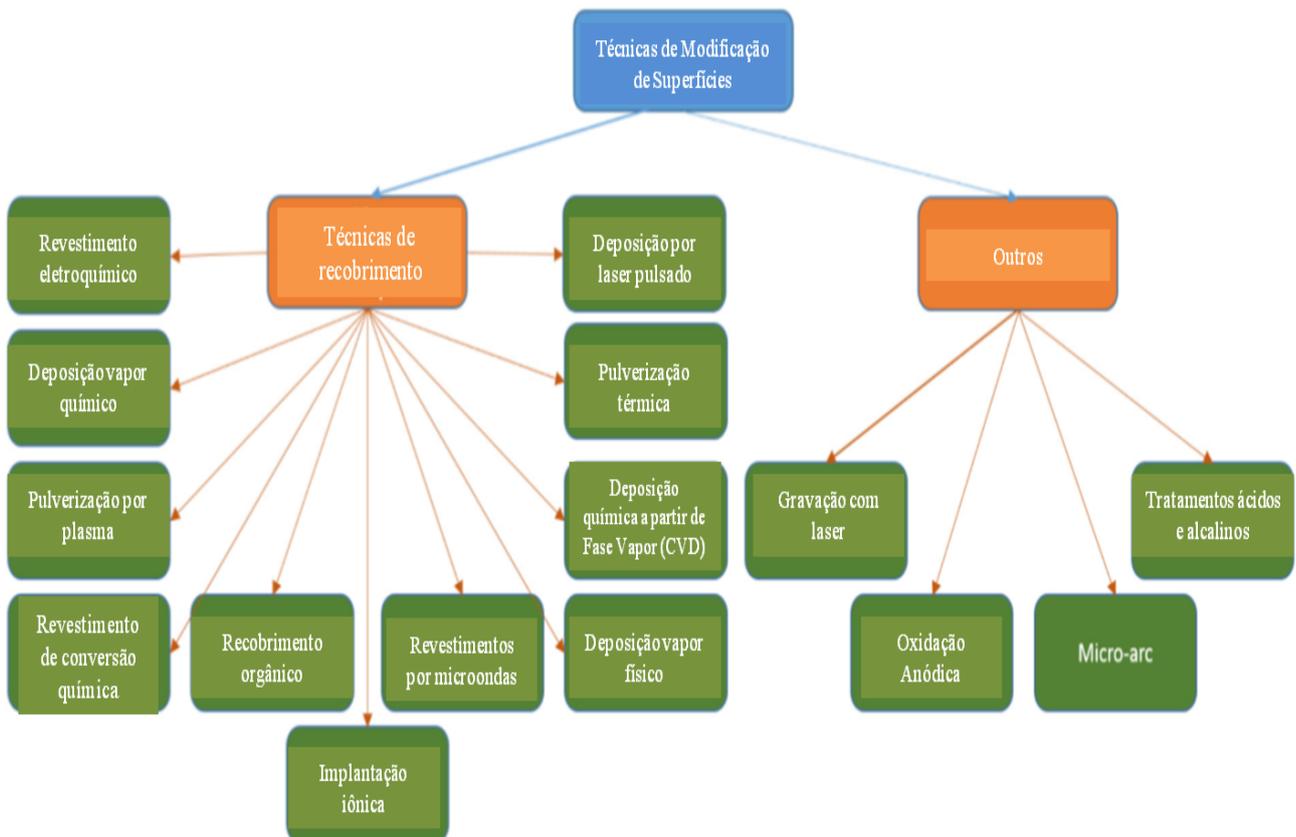


Fonte: Adaptado de HAO et al. (2017).

Modificações de superfícies dos biomateriais 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 aperfeiçoar o desempenho do sistema, minimizando simultaneamente as perdas funcionais decorrentes da substituição do tecido ou órgão lesionado pelo biomaterial

implantado (ORÉFICE et al., 2012). Por esta razão, modificações em superfícies nanoestruturadas exercem um impacto direto nos eventos moleculares e celulares sendo determinante para a resposta biológica a um implante (por exemplo, adesão celular, adsorção de proteínas e proliferação). Com esta finalidade, diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas para projetar superfícies nanoestruturadas em implantes, como por exemplo: o método eletroquímico (como oxidação anódica) (ZINGER et al., 2004), revestimento eletroquímico (YU et al., 2011), deposição de vapor físico (PVD) (CHU, 2002), revestimento de conversão química (ROJAEE et al., 2013), pulverização térmica (BOLELLI et al., 2014), revestimento orgânico (SIMA et al., 2015), entre outros (Figura 10). Essas técnicas oferecem novas superfícies de implantes com características controladas na escala nanométrica. A técnica específica deve ser selecionada com base nos parâmetros físico-químicos e geometria desejada (KUMAR et al., 2020).

Figura 10 – Diferentes técnicas para modificação de superfícies de biomateriais.



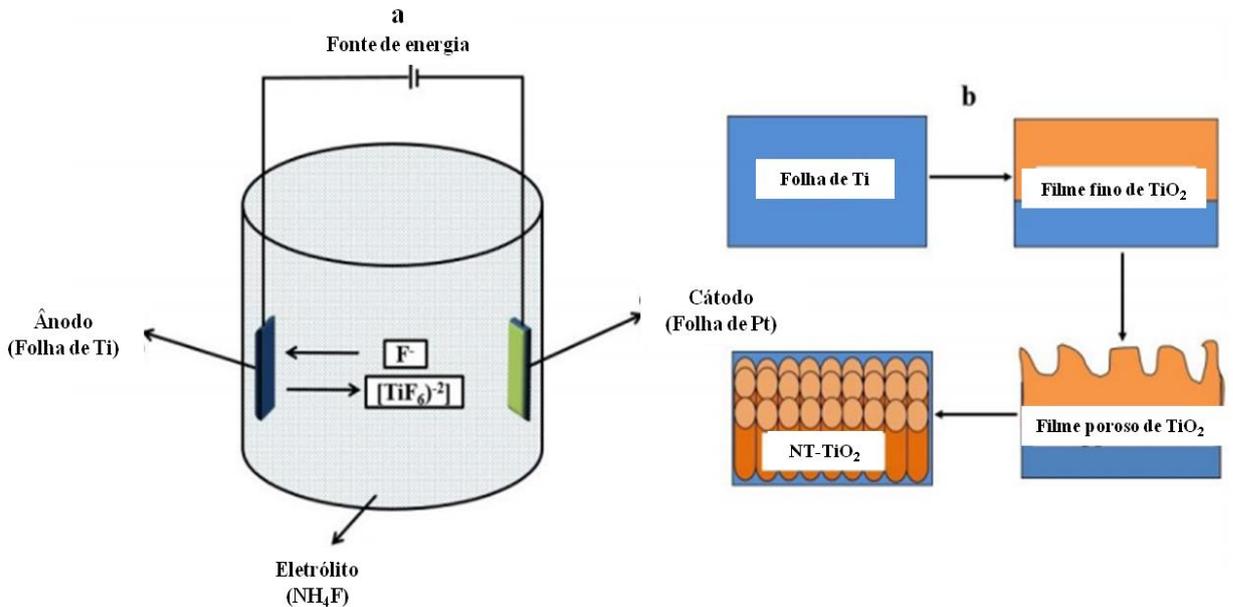
Fonte: Adaptado de Kumar et al. (2020).

1.5.1 Anodização e Nanotubos de TiO_2

A oxidação anódica, ou anodização, é um processo de oxidação eletroquímica acelerada, baseada em reações de eletrodos que levam à formação de um filme de óxido na superfície do metal do ânodo (LIU et al., 2004). O titânio é revestido por uma camada superficial de óxido de 1,5 a 10 nm de espessura que se forma naturalmente quando a sua superfície é exposta ao ar em temperatura ambiente. Durante este processo, o filme de óxido produzido é mais espesso do que o formado espontaneamente na superfície do metal. Vale salientar que o filme de óxido tem um papel muito importante na biocompatibilidade do implante, pois é essa superfície, e não o corpo principal do implante de titânio, que entra em contato direto com o tecido ósseo (KUROMOTO et al., 2007) (Figura 11).

A anodização geralmente ocorre em uma célula eletroquímica (Figura 11a). O sistema é alimentado por uma fonte de corrente contínua no qual o ânodo é a chapa de titânio e o cátodo é um metal inerte - como cobre, platina, aço inoxidável - e estes eletrodos ficam imersos em uma solução eletrolítica, que na maioria das vezes contém íons fluoreto. O princípio da produção dos nanotubos é a competição e o equilíbrio entre a oxidação eletroquímica e a dissolução química (MACAK et al., 2007). O processo pode ser dividido em três etapas, de acordo com a curva da reação: a diminuição inicial (dominância da oxidação), o aumento subsequente (domínio da dissolução química) e o estágio final (equilíbrio entre dissolução e oxidação química). Primeiramente, ocorre a oxidação do titânio em dióxido de titânio (TiO_2), formando uma película fina e compacta do óxido na superfície do titânio. Em seguida, os íons fluoreto (F^-) adsorvidos na superfície do titânio reagem com a camada de óxido, resultando em uma película fina porosa. Finalmente, o titânio solúvel forma o complexo de fluoreto [$(TiF_6)^-$ 2] e dissolve-se gradualmente da superfície do titânio, resultando nas estruturas porosas que são os nanotubos de dióxido de titânio (NT- TiO_2) (Figura 11b) (AWAD et al., 2017).

Figura 11 – Esquema da anodização eletroquímica



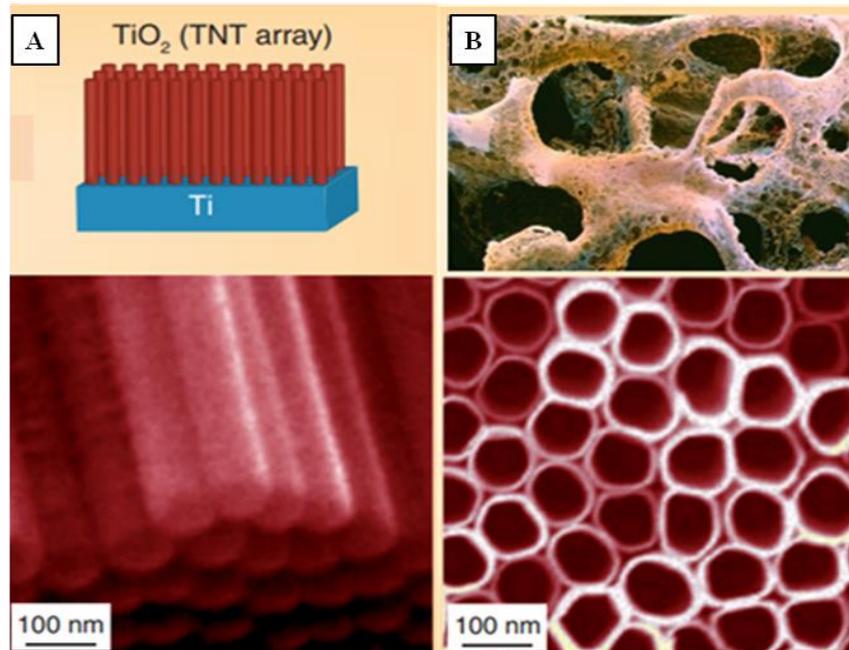
Fonte: Adaptado de Awad et al (2017)

Legenda: (a) Esquema experimental da célula eletroquímica e (b) mecanismo de formação dos NT- TiO₂.

Os nanotubos formados são majoritariamente ordenados, bem definidos, alinhados perpendicularmente e dispostos hexagonalmente na superfície metálica como mostrado na Figura 12a; além disso, esses nanotubos são fechados na parte inferior e abertos na parte superior, numa geometria que mimetiza a trabécula óssea natural (Figura 12b) (GONG et al., 2001; ROY et al, 2011; GULATI et al., 2016).

Além de ser uma técnica simples e efetiva, a anodização também é bastante versátil visto que vários fatores afetam a geometria, cristalografia e topografia dos NT-TiO₂ fabricados, incluindo a tensão aplicada, tempo de anodização, tipo de eletrólito, solventes, temperatura e estado da solução eletrolítica durante a anodização (AWAD et al., 2017). Após a anodização, os nanotubos produzidos são frequentemente submetidos a um tratamento térmico em alta temperatura (400 a 600°C) para transformar o TiO₂ de uma fase amorfa para uma fase cristalina (ROGUSKA at al., 2011). Os nanotubos da fase cristalina possuem uma adesão mais forte ao titânio, melhores propriedades elétricas e alta resistência à corrosão na solução de Hank's do que os NT-TiO₂ amorfos (BAI et al., 2011). A presença destes nanotubos na superfície plana do titânio altera as propriedades estruturais do substrato, tornando-o mais atraente devido à maior porosidade e maior área superficial. Como consequência desta organização nanoestruturada dos NT-TiO₂ temos uma melhoria das condições favoráveis para adesão celular e o crescimento de tecidos.

Figura 12 – Estrutura dos nanotubos de titânio



Fonte: Adaptado de Gulati et al (2012)

Legenda: (A) Alinhamento vertical e digitalização da parte interior de nanotubos; (B) comparação da geometria da trabécula óssea e da parte superior dos nanotubos.

1.5.2 Dip coating e spin coating

Juntamente à melhoria no desempenho dos nanotubos para aplicação em implantes osseointegrados, essas matrizes nanotubulares também têm sido funcionalizadas com diferentes moléculas, tanto de origem sintética como de origem biológica, com o objetivo de combinar propriedades que ainda são limitadas, como por exemplo, a inserção de agentes antibacterianos para reduzir infecções pós-operatória e de polímeros ou proteínas que sejam capazes de aumentar a osteogênese.

Para aumentar a biocompatibilidade dos nanotubos de TiO_2 , o material pode ser funcionalizado com moléculas citocompatíveis que podem estimular a migração de células para o local do implante, aumentar a adesão celular, promover a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais e até estimular a proliferação de células osteoblásticas. Outra abordagem utilizada nos estudos é o uso de substâncias bactericidas, bacteriostáticas ou que apenas ajudem a impedir a adesão de células bacterianas na superfície dos nanotubos de TiO_2 , e conseqüentemente, evitar a formação de biofilme bacteriano e a perda do implante (OLIVEIRA et al., 2017).

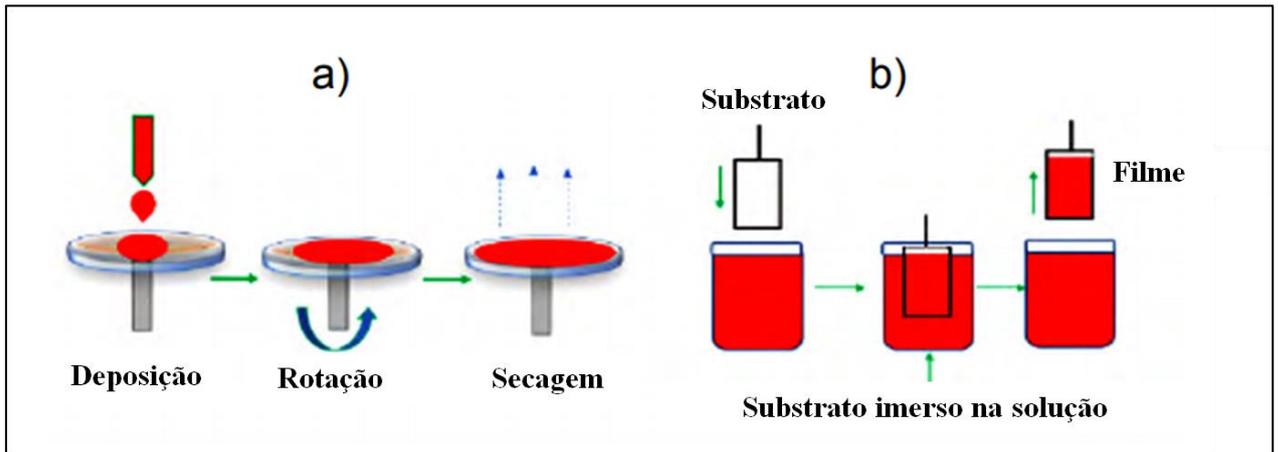
A adsorção de biomoléculas pode ocorrer por métodos físicos, como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, ou por métodos químicos, como por exemplo, a ligação covalente com formação de ligações éter, amida e tioéter. Os métodos de revestimento sol-gel são classificados em dois tipos: revestimento por imersão (*dip coating*) e revestimento por rotação (*spin coating*) (BAKRI et al., 2016).

A técnica de *spin coating* é baseada na aplicação de uma solução em um substrato rotativo com subsequente ejeção e evaporação do solvente. Esta técnica, representada esquematicamente na Figura 13, consiste em depositar gotas da solução inicial sobre um substrato que é então acelerado rapidamente até a velocidade de rotação desejada (Figura 13a). O líquido flui radialmente, devido à ação da força centrífuga, e o excesso é ejetado para fora da borda do substrato. A viscosidade da solução, o tempo e a velocidade de rotação são parâmetros importantes para a deposição de um filme estável e homogêneo (ZARPELON, 2013).

O revestimento por *dip coating* (Figura 13b) consiste na imersão do substrato em uma solução seguida de drenagem gravitacional e evaporação do solvente. Esta técnica consiste em mergulhar verticalmente um substrato dentro de uma solução que contém a substância de interesse e depois de certo tempo retirá-lo do mesmo. Devido à aderência entre as moléculas da solução e a superfície do substrato, uma fina camada será formada. A espessura das camadas é principalmente afetada pela viscosidade e densidade do fluido, e pela tensão superficial. O processo de imersão e emersão deve apresentar velocidade controlada e nenhum tipo de vibração, a fim de permitir uma deposição homogênea. Além disso, o tempo de deposição também é um fator importante na qualidade do filme. (ZARPELON, 2013).

Ambos os métodos permitem a formação de um filme homogêneo na superfície do substrato (OLIVEIRA et al., 2017) e podem ser usados para montagem *Layer by Layer (LbL)*, na qual é possível formar multicamadas de polieletrólitos com cargas opostas atraídos por interação eletrostática, na superfície de um determinado substrato (SHI et al, 2017).

Figura 13 – Técnicas de deposição de filmes finos



Fonte: Adaptado de MADEIRA et al (2019)

Legenda: (a) *Spin coating*; (b) *dip coating*.

1.5.3 Técnica de auto-montagem *Layer by Layer*

A técnica de auto-montagem por *LbL* foi proposta por Decher (1998) e atraiu muita atenção, pois fornece uma metodologia simples, útil e versátil para modificações na superfície do material. Estudos recentes demonstraram sua utilidade em uma ampla gama de aplicações, incluindo armazenamento de energia (XIANG et al., 2012), engenharia de tecidos e células e entrega de medicamentos (SHUKLA; ALMEIDA, 2014). Além disso, a técnica *LbL* vem sendo mais amplamente utilizada para modificação de superfície do implante dentário de titânio (SHI et al, 2017).

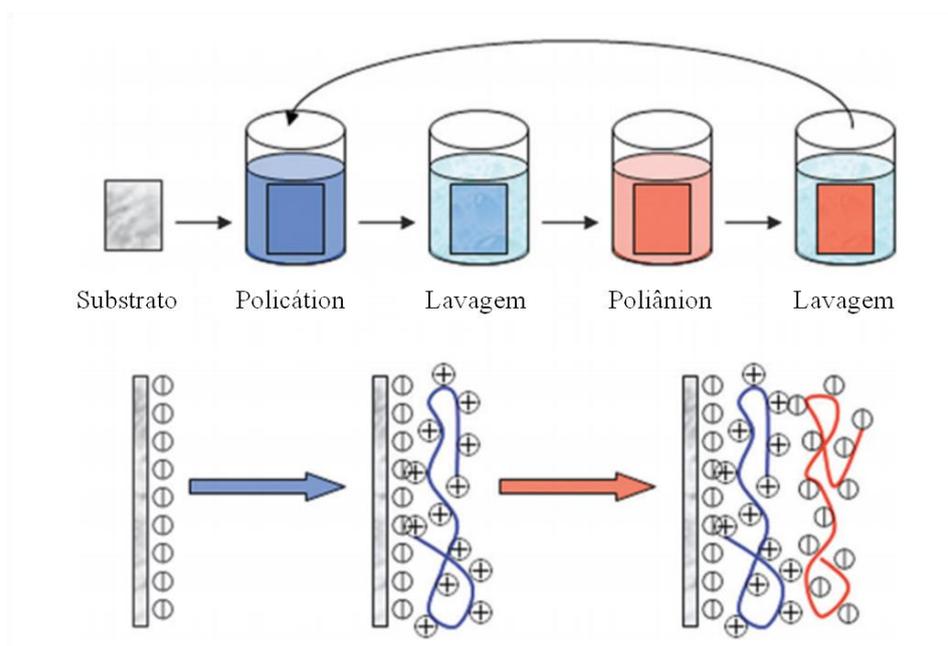
A montagem de multicamadas *LbL* é impulsionada por interações eletrostáticas entre constituintes com carga oposta. Esse acúmulo pode controlar com precisão a composição, morfologia e estrutura do filme. O processo ocorre conforme ilustrado na figura 14. Um substrato carregado é imerso em uma solução que consiste em polieletrólitos carregados de maneira oposta para formar a primeira monocamada por adsorção. Este passo é seguido por um passo de lavagem para remover as espécies fracamente ligadas ou não ligadas e impedir a contaminação cruzada de polieletrólitos com carga oposta. Em seguida, o substrato revestido em monocamada é imerso em outra solução de polieletrólitos carregados de maneira oposta para formar a segunda monocamada por absorção. Esse processo é repetido até que as multicamadas desejadas sejam formadas (CUI et al., 2015; VILLIERS et al., 2011).

No processo de montagem, a atração eletrostática é a força principal, mas ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações covalentes e interações biológicas também

desempenham papel importante (CUI et al., 2015; VILLIERS et al., 2011). Uma variedade de materiais como por exemplo, titânio, vidro e silício, podem ser usados como substrato na montagem sem alterar significativamente as propriedades físicas e mecânicas do substrato. Comparado à outros métodos, o *LbL* tem muitas vantagens: o processo de montagem é simples e não requer equipamentos especiais; pode incorporar diversas moléculas mantendo a atividade biológica, visto que os filmes são formados por interações eletrostáticas e sob condições amenas, sendo possível o controle da liberação local de moléculas através de ajustes nas propriedades físicas e químicas dos materiais auto-montados.

Apesar de o processo de auto-montagem ser simples e leve, ele pode ser afetado por muitos fatores, como a concentração e a força iônica da solução de polieletrólito, pH, temperatura, tempo de montagem, peso molecular e tamanho. Esses fatores afetam a morfologia, espessura e outras características biológicas do filme montado (SHI et al, 2017; VILLIERS et al., 2011).

Figura 14 – Esquema de automontagem de filmes finos por *Layer by Layer*



Fonte: Adaptado de Xiang et al (2012).

Muitos polieletrólitos podem ser utilizados para formar as multicamadas, incluindo polímeros, proteínas, ácidos nucleicos, drogas e nanopartículas inorgânicas (SHUKLA; ALMEIDA, 2014). Exemplos comuns de polímeros sintéticos usados na montagem por *LbL* incluem o poli(hidroclorato de alilamina) (PAH) e poli(ácido acrílico) (PAA) que formam o sistema PAH/PAA. Os filmes obtidos por estes polímeros também mostraram ser biocompatíveis e promover a adesão celular por interações eletrostáticas (GUO et al., 2017). A

principal vantagem em se utilizar esses polieletrólitos na preparação de filmes finos reside no fato de que eles apresentam densidades de carga que podem ser alteradas pelo ajuste do pH da solução de imersão, o que permite o controle da espessura da camada e da organização das cadeias de polímero adsorvidas (MACHADO et al., 2009).

As biomoléculas podem se adsorver na superfície do titânio diretamente ou por meio de agentes ligantes, como os polímeros. Estes revestimentos poliméricos são capazes de prolongar a liberação das moléculas que estão transportando, no meio em que foram inseridos. Por todas as vantagens e inovações tecnológicas descritas até aqui, a funcionalização da superfície de nanotubos de titânio tem sido uma estratégia aplicada para agregar ao biomaterial características das moléculas imobilizadas, como evitar a formação dos biofilmes causadores de infecções e estimular a proliferação de osteoblastos, favorecendo o processo de ossointegração.

1.5.4 Recobrimento com Prata

Muitos estudos revelaram novas abordagens interessantes para modificações de superfície, com o objetivo de criar um ambiente antibacteriano nos implantes de titânio: cobrindo com vidro biológico, ouro, prata, aplicação de antibióticos ou outras drogas antibacterianas na composição dos revestimentos, etc. Dentre estas, o recobrimento com partícula de prata tem sido reconhecido pela comunidade médica por sua eficácia antimicrobiana desde meados do século XVIII. No entanto, somente na década de 1920 seu uso foi aprovado pela *US Food and Drug Administration* (FDA). Com o descobrimento dos antibióticos, por volta de 1940, os colóides à base de partículas metálicas acabaram sendo descartados. Todavia, as bactérias se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, forçando à síntese constante de novas drogas, o que na maioria das vezes não acompanha a velocidade de mutações das bactérias e conseqüentemente, do aparecimento de cepas resistentes a estes compostos (GIBBS, 1999). O efeito antimicrobiano da prata tem sido utilizado em 28 diferentes campos da medicina como, por exemplo, na profilaxia da oftalmia neonatal, na cicatrização de feridas e em biomateriais (LIMA, 2011).

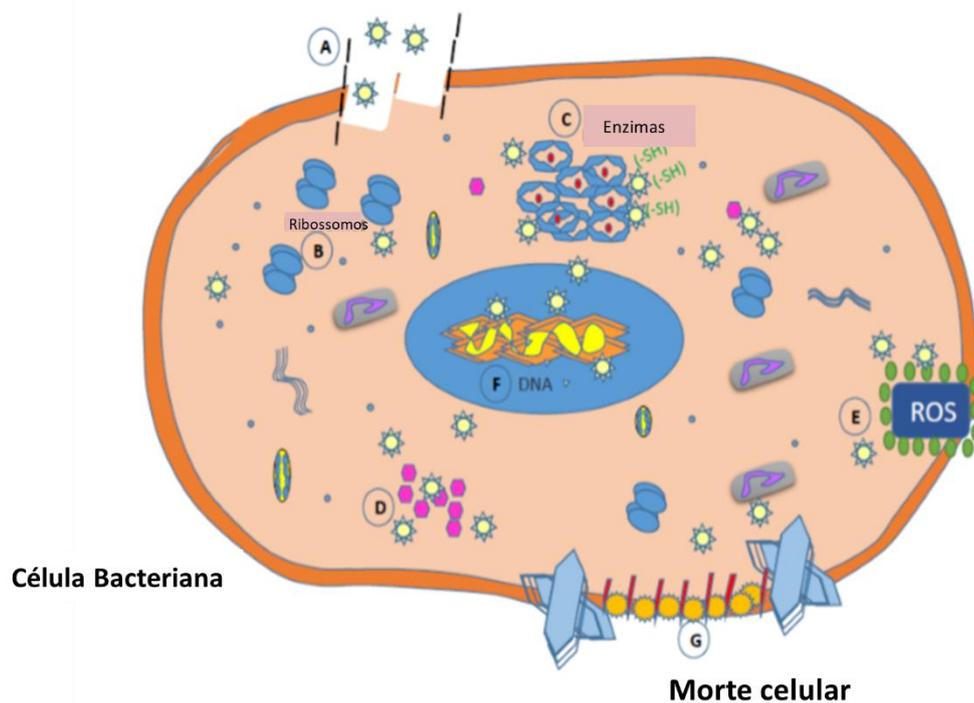
Na área de nanotecnologia, as nanopartículas de prata (AgNPs) vêm se destacando, pois seu a diminuição do seu tamanho aumenta a área superficial aumentando a ação antimicrobiana sem causar efeito negativo nas propriedades mecânicas do biomaterial (PEULEN; WILKINSON, 2011). Além disso, as nanopartículas são finamente dispersas e podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos aos organismos superiores, visto que a concentração efetiva para a atuação contra microrganismos é de 0,1 µg/L e a

concentração tóxica para os seres humanos é de 10 mg/L (ZARPELON, 2013). Mesmo na organização de biofilme, nos quais os microrganismos são resistentes a agentes antibacterianos, o tamanho pequeno das AgNPs possibilita a penetração nas membranas bacterianas, causando dano ao DNA e morte celular (CHALOUPKA et al., 2010).

Embora vários mecanismos tenham sido propostos para ação antibacteriana das AgNPs, o modo exato de ação não é completamente compreendido. De acordo com Marambio-jones e Hoek (2010), os modos de ação mais comuns podem ser: (I) A absorção dos íons de prata livres, causando a interrupção das moléculas de ATP e impedindo a replicação do DNA; (II) Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS); (III) Danos diretos à membrana pelos íons de prata (Ag^+), resultando em lise celular. As diferentes etapas da ação antimicrobiana das AgNPs estão exibidas na figura 15.

A ação antibacteriana das AgNPs deve-se principalmente à liberação de íons Ag^+ . A liberação de Ag^+ é mais alta quando AgNPs menores são usados. Nanopartículas na faixa de 1-10 nm possuem interação direta com a superfície da membrana celular, alteram a permeabilidade e causam danos às células (MORONES et al., 2005). Apesar de diversos estudos demonstrarem a eficácia das AgNPs a comparação entre os resultados é bastante difícil devido à diferentes metodologias empregadas na produção destas estruturas (meios e tempos de liberação de íons Ag^+ , linhagens bacterianas, tipos e condições de cultura). Na superfície de implantes biomédicos, sabe-se que elas impedem a adesão bacteriana e formação de biofilme. Como resultado, a prata tem sido incorporada à superfície de uma variedade de dispositivos médicos, tais como cateteres vasculares, urinários, enxertos, suturas cirúrgicas e dispositivos de fixação de fratura. Para esta finalidade, nanopartículas podem ser sintetizadas por diversas rotas e incorporadas à superfície de biomateriais, sendo depositadas diretamente sobre a superfície do dispositivo, ou aplicadas em um revestimento superficial polimérico (MEI et al., 2014).

Figura 15 – Possíveis modos de ação antimicrobiana de nanopartículas de prata



Fonte: Adaptado de Bapat et al. (2018)

Legenda: (A) Difusão e absorção de nanopartículas na célula bacteriana: Os íons Ag^+ causam destruição do peptídeoglicano da parede bacteriana e lisam a membrana celular. (B) Desestabilização dos ribossomos: ocorre a desnaturação dos ribossomos, inibindo a síntese de proteínas e causando a degradação da membrana plasmática. (C) Interação enzimática: as AgNPs se ligam ao grupo sulfidril (-SH) nas enzimas respiratórias e as desativam. (D) Interrupção da cadeia de transferência de elétrons: as AgNPs interferem no transporte de elétrons, afetando a via de sinalização. (E) Espécies reativas de oxigênio (ROS): O dano mitocondrial induz a geração de ROS que oxidam proteínas. (F) Danos no DNA: as AgNPs se ligam ao DNA, impedindo sua replicação e multiplicação, causando apoptose. (G) Morte Celular: a formação de fendas e perfurações na membrana celular leva à liberação de organelas celulares e morte celular.

1.6 Lectinas como agentes funcionalizantes de nanotubos de TiO_2

Atualmente, o termo lectina é aplicado para denotar todas as proteínas ou glicoproteínas que possuem, pelo menos, um domínio não catalítico e são capazes de se ligarem, reversivelmente, a monossacarídeos ou oligossacarídeos específicos, sem alterar as suas propriedades (LAM; NG, 2011). As lectinas podem ser encontradas em uma ampla gama de organismos, desde de microrganismos à plantas e animais.

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 et al 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, antivirais (BAINS et al., 2005), antimicrobiana (CARVALHO et al., 2012), antibacteriana (NUNES et al., 2011), inseticida (MACEDO et al., 2007), mitogênica (MACIEL et al., 2004), proliferativa (MELO et al., 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).

O reino animal tem demonstrado ser um rico manancial para obtenção de lectinas, servindo como fonte para o isolamento e caracterização dessas moléculas. A primeira atividade de lectina animal, provavelmente, foi observada no veneno de serpentes, o qual foi capaz de promover a aglutinação de eritrócitos humanos (KILPATRICK, 2002). Com base na estrutura molecular, as lectinas animais podem ser classificadas em cinco principais categorias: tipo-C, tipo-S, tipo-I, tipo-P e tipo-N (SHARON, 2004). As lectinas do tipo C são uma grande família de lectinas dependentes de Ca^{+2} e desempenham papéis relevantes na sinalização celular, imunidade inata, diferenciação e adesão celular. No sistema imunológico humano, induzem a secreção de citocinas e outros mediadores imunes, modulando assim a inflamação e a imunidade (CHIFFOLEAU, 2018; PATIN et al., 2017). De acordo com as características estruturais e funcionais, as lectinas do tipo C podem ser subclassificadas em 17 grupos (do I ao XVII).

Os venenos de serpentes possuem uma variedade de proteínas, tais como serinoproteases, fosfolipases, desintegrinas (LIMA et al., 2005), toxinas *three-finger* (3FTxs) (PAHARI et al., 2007), metaloproteases e lectinas tipo-C (DOLEY; KINI, 2009). Lectinas foram isoladas do soro de serpentes da família *Viperidae*, *Elapidae* e *Crotalidae*. As lectinas do tipo C encontradas em venenos de serpentes estão incluídas no grupo VII e sua especificidade de ligação é mais freqüentemente atribuída à galactose, mas também à manose (EBNER et al., 2003). De acordo com sua estrutura e funções biológicas, essas proteínas podem ser classificadas em dois subgrupos: lectinas tipo-C verdadeiras (CTLs), as quais contêm um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) que se liga a açúcar e aglutina eritrócitos; e proteínas relacionadas com lectinas tipo-C com CRD incompleto e, portanto, apresentando outras atividades biológicas contra os fatores de coagulação e plaquetas, afetando a hemostasia (MORITA et al., 2004). Este segundo grupo foi renomeado para snaclecs (lectinas tipo-C de venenos de serpentes) (CLEMETSON et al., 2009).

1.6.1 Lectina do veneno de *Bothrops leucurus* (BIL)

A lectina do veneno da serpente *Bothrops leucurus* (BIL) é uma proteína da classe β de 30 kDa composta por duas subunidades de 15 kDa, com afinidade de ligação à galactosídeos e foi isolada e caracterizada por Nunes e colaboradores (2011). Estudos demonstraram que BIL possui atividade biológica contra bactérias Gram-positivas (NUNES et al., 2011), linhas de células tumorais (ARANDA-SOUZA et al., 2014; NUNES et al., 2012) e parasitas protistas do gênero *Leishmania* (ARANDA-SOUZA et al., 2018). As variadas e relevantes atividades biológicas da BIL fazem desta proteína um excelente modelo de estudo em diferentes campos de pesquisa, como sinalização celular, diferenciação celular, produção de citocinas e outros mediadores. Estas proteínas bioativas, que demonstram contribuição no processo de adesão celular como também ação bactericida, podem ser candidatas à imobilização na superfície de implantes, a fim de acelerar o processo de osseointegração e combater possíveis infecções.

2 JUSTIFICATIVA

A rejeição a biomateriais representa um sério problema, ressaltando a necessidade de um olhar mais atento aos mecanismos envolvidos na interação tecido-material. A modificação da superfície dos implantes é uma estratégia comprovadamente eficiente na melhora dos processos de adesão e proliferação celular. O objetivo deste trabalho é sintetizar nanotubos de dióxido de titânio e revestir sua superfície com polímeros, nanopartículas de prata e a lectina BIL a fim de melhorar a biocompatibilidade e suplantiar os riscos de infecção associados ao uso de implantes.

Este estudo é uma continuação da nossa linha de pesquisa com biomateriais que começou a ser desenvolvida durante o mestrado acadêmico, cursado no próprio IAM. Além da dissertação, o projeto gerou resultados que foram formatados em um artigo científico aceito para publicação em revista de circulação internacional.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a biocompatibilidade e a atividade bactericida de nanotubos de dióxido de titânio (TiO₂) revestidos com nanopartículas de prata e revestidos com lectina de *Bothropus leucurus*.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Sintetizar e caracterizar nanotubos de TiO₂ revestidos com nanopartículas de prata e revestidos com lectina de *Bothropus leucurus*;
- b) Avaliar os efeitos das modificações das superfícies de nanotubos de TiO₂ sobre adesão de osteoblastos humanos;
- c) Avaliar os efeitos das modificações das superfícies de nanotubos de TiO₂ sobre a viabilidade celular de osteoblastos humanos;
- d) Avaliar os efeitos das modificações das superfícies de nanotubos de TiO₂ sobre a osteogenesis de osteoblastos humanos;
- e) Avaliar o potencial bactericida das diferentes superfícies de nanotubos de TiO₂.

4 METODOLOGIA

A metodologia utilizada compreendeu quatro etapas compreendidas em: Síntese, Caracterização, Avaliação da biocompatibilidade e atividade bactericida, conforme descrito nos itens abaixo.

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 TiO_2 foram formados pelo processo de anodização com eletrólito a base de 89.3% de etilenoglicol/ 0,7% de fluoreto de amônia em água destilada sob um potencial de 30V por 30 minutos à 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 Revestimento da matriz nanotubular de TiO_2 com nanopartículas de prata

Primeiramente, as amostras de nanotubos de TiO_2 (NT- TiO_2) foram incubadas por 10 minutos em uma solução etanólica de hidróxido de sódio (NaOH) à 10% e subsequentemente lavadas 3 vezes, por 2 minutos cada, em água destilada. Este processo foi feito com o intuito de conferir carga negativa às amostras. Em seguida, os nanotubos de TiO_2 foram impregnados com nanopartículas de prata (AgNPs) através do método de dip *coating* de automontagem *Layer by Layer*. 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 poli-(hidroclorato de alilamina) (PAH) e poli-(ácido acrílico) (PAA), na

concentração de 0,01M e pHs variados. O procedimento consistiu na deposição de 7 ou 8 camadas de PAH e PAA sobre as amostras NTs-TiO₂ negativas.

Para a funcionalização com AgNPs, as amostras foram imersas em solução aquosa de acetato de prata (7 ou 10 mM) durante 1 hora e, então, removidas e lavadas 3 vezes em água destilada. Para a obtenção das AgNPs a prata foi reduzida através da exposição à radiação UV (365nm) por 12 horas.

4.1.2 Revestimento da matriz nanotubular de TiO₂ com lectina de *Bothropus leucurus*

A lectina BIL, obtida do veneno da peçonha *Bothropus leucurus*, foi purificada, gentilmente cedida pela Dra. Mary Ângela Aranda de Souza para do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães. Os métodos de purificação e caracterização foram descritos previamente por Nunes et al. (2011). A solução estoque da lectina foi preparada em tampão Tris - HCl, pH 7,2, em uma concentração de 3 mg/mL e armazenada a -20°C. Para revestimento das amostras, a BIL foi diluída em concentrações de 100 e 200 µg/mL em tampão PBS e impregnada na superfície das amostras de titânio de duas maneiras distintas: através do método *dip coating* por *Layer by Layer*, e também pelo método de *spin coating*.

Para o método por *dip coating*, o processo de negativação da superfície e de automontagem por *Layer by Layer* nas amostras de TiO₂ foi feito como descrito anteriormente. Após esta etapa, as amostras foram incubadas por 1 hora com 100 µL das diferentes concentrações da lectina para formação dos filmes.

Para amostras submetidas ao método do *spin coating*, o filme com as diferentes concentrações da lectina foi preparado logo após o tratamento térmico das amostras. Este processo foi realizado através do gotejamento de 100 µL da solução de lectina sobre as amostras de TiO₂, numa velocidade de 500 rpm seguida de uma aceleração de 2000rpm utilizando o Spin Coater Model WS-650Mz-23 (Laurell Technologies Corporation).

4.2 Caracterização das amostras

Para caracterização das amostras, foram utilizadas as seguintes metodologias:

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 (FEG/EDS – Philips QUANTA 200F, com detector EDAX).

4.2.2 Difração de Raios X (DRX)

A fase cristalina dos nanotubos de TiO₂ e das AgNPs, 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°, com radiação CuK α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), utilizando um passo angular de 0,05° 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 Síncrotron (LNLS).

4.2.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram obtidos entre 4000 e 400 cm⁻¹ com um espectrômetro de infravermelho FT-IV Bruker modelo Vetex 70 por ATR empregando um cristal de Germânio. 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. Os sinais foram calculados sobre 16 *scans*, com resolução de 4 cm⁻¹.

4.2.4 Medidas Eletroquímicas

Os dados das análises eletroquímicas foram obtidos utilizando Potenciostato Autolab PGSTAT302N (Metrohm) controlado por computador através do software Nova 2.0. As análises foram realizadas em uma célula de três eletrodos, utilizando as amostras suportadas no substrato de Titânio metálico como eletrodo de trabalho, contra eletrodo de Platina e eletrodo de referência de Ag/AgCl (3,0 M KCl). O eletrólito consistiu de uma solução de fluido corporal simulado (FCS) na concentração 1,5, preparado de acordo com o método de Kokubo (2006), sendo aplicado a uma área controlada de 1 cm² das amostras. Nas análises de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foi utilizado a faixa de frequência de 10⁻¹ Hz a 10⁵ Hz, com

amplitude de onda pico a pico de 10 mV. Para as análises de polarização cíclica potencio-dinâmica as varreduras foram realizadas na faixa de -0,5 V (vs Ag/AgCl) a +0,9 V (vs Ag/AgCl). A taxa de varredura foi de 10 mV/s.

4.3 Avaliação da Biocompatibilidade

Após síntese e caracterização, todas as amostras foram testadas mediante células de osteosarcoma humano sob diversos protocolos, para avaliação da biocompatibilidade *in vitro*.

4.3.1 Cultivo das células de osteosarcoma humano.

Para a investigação da biocompatibilidade *in vitro*, a linhagem celular de osteosarcoma HOS (ATCC® CRL-1543™) foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO₂, em meio MEM suplementado com 10% de SFB e utilizada como modelo de células osteoblásticas humana em todos os experimentos. Para todos os ensaios biológicos foi usada uma densidade de 1x10⁴ células/ mL suspensas em meio MEM. As células foram então distribuídas sobre as amostras em placas de 24 poços nas condições de cultivo descritas acima e incubadas à 37°C e 5% CO₂ por diferentes intervalos de tempo que variaram entre 1 e 7 dias de cultivo. Previamente à incubação com as células, as amostras de NTs-TiO₂ foram esterilizadas por exposição à UV por 15 minutos.

4.3.2 Avaliação da citotoxicidade da lectina BIL

A citotoxicidade da lectina BIL isolada foi avaliada após 7 dias de incubação, pelo método do MTT. Esta técnica tem como princípio a redução do MTT por redutases mitocondriais em células metabolicamente ativas, com a formação de cristais que são solubilizados em DMSO e analisados espectrofotometricamente. Para tal, células HOS foram aderidos em placas de 96 poços por incubação *overnight*. Após esse período, o meio foi removido e as células incubadas na presença de diferentes concentrações da lectina BIL, previamente diluída em meio de cultura fresco. Após 7 dias de incubação, o meio foi retirado e foram adicionados a cada poço 100µl de meio de cultura sem vermelho de fenol suplementando com 10% de SFB e 10 µl 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 100µl de DMSO foram adicionados para solubilizar

o precipitado. As placas foram agitadas por 15 minutos e a absorvância foi medida a $\lambda=595\text{nm}$ no espectrofotômetro. Osteoblastos incubados apenas com meio de cultura foram utilizados como controle.

4.3.3 *Teste de Adesão*

A fim de avaliar a capacidade de adesão das células na superfície das amostras, células HOS foram cultivadas por um período de 24 horas sobre o titânio, contendo ou não, os diferentes tratamentos, descritos acima. 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. Para visualização dos núcleos, as células foram marcadas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen) por 5 minutos, seguida de mais duas lavagens com PBS à 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 10x. O número de células aderidas em cada amostra foi estimado pela média destas contagens.

4.3.4 *Avaliação Morfológica*

Para observar o efeito das diferentes modificações da superfície do titânio sobre a morfologia celular, células HOS foram cultivadas sobre o titânio submetido ou não aos diferentes tratamentos por um período de 24 horas. Após a incubação, as amostras foram lavadas em PBS, fixadas em solução de 2,5% glutaraldeído+0,1M tampão cacodilato de sódio por duas horas, lavadas e pós-fixadas em uma solução de 1% tetróxido de ósmio +0,8% ferricianeto de potássio+5mM de CaCl_2 em 0,1M tampão cacodilato de sódio por 1 hora, no escuro. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 3x 100%), secas em aparelho de ponto crítico, metalizadas com ouro (15 nm) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (FEG/EDS – Philips QUANTA 200F, com detector EDAX).

4.3.5 Análise da Viabilidade Celular

A viabilidade das células cultivadas sobre as diferentes superfícies de titânio foi avaliada através do método do MTT. Esta técnica tem como princípio a redução do MTT por redutases mitocondriais em células metabolicamente ativas, com a formação de cristais que são solubilizados em DMSO e analisados espectrofotometricamente. Após o cultivo das células por 72 horas sobre as superfícies de NTs-TiO₂, o meio foi retirado e foram adicionados a cada poço 500µl de meio de cultura sem vermelho de fenol suplementando com 10% de SFB e 50µl 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 500µl de DMSO foram adicionados para solubilizar o precipitado. As placas foram agitadas por 15 minutos, e a reação transferidas para placas de 96 poços para medida da absorbância à $\lambda=595\text{nm}$ no espectrofotômetro.

4.3.6 Avaliação do Potencial Osteogênico

O efeito dos diferentes tratamentos da superfície dos NTs-TiO₂ sobre a capacidade das células HOS aderidas de formar uma matriz óssea, foi avaliada através da detecção da atividade da enzima fosfatase alcalina. Após 72 horas de cultivo sobre as estas superfícies, as amostras de TiO₂ foram lavadas três vezes com PBS, transferidas para uma nova placa de 24 poços. As células foram então lisadas em solução por ciclos de congelamento/descongelamento em solução contendo 0,5% Triton X-100 diluído em PBS. 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, São Paulo, Brasil), segundo recomendação do fabricante. 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 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 aos testes. 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 Investigação da Atividade Bactericida

A atividade bactericida das amostras foi avaliada, utilizando *Staphylococcus aureus* como modelo. As amostras foram testadas através de uma adaptação da técnica de difusão em disco em Ágar descrita por Bauer et al. (1966). Essa adaptação consiste na substituição dos discos de inibição impregnados com antibióticos pelas amostras de titânio contendo nanotubos impregnados com AgNPs ou lectina, bem como os controles. Os diâmetros das zonas de inibição por difusão de disco foram analisados após 24 horas de incubação a 37°C.

4.4 Análises Estatísticas

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 Padronização das amostras revestidas com Ag

A fim de obter uma padronização e otimização das amostras de nanotubos de TiO₂ (NT-TiO₂) revestidas com nanopartículas de prata (AgNPs), após o processo de anodização as amostras foram submetidas ao revestimento com os polímeros PAH e PAA em diferentes condições de pH e número de camadas, conforme tabela 1. Após esse processo, todas as amostras foram impregnadas com uma solução de acetato de prata à 7mM e expostas por 12 horas à luz UV para formação das nanopartículas.

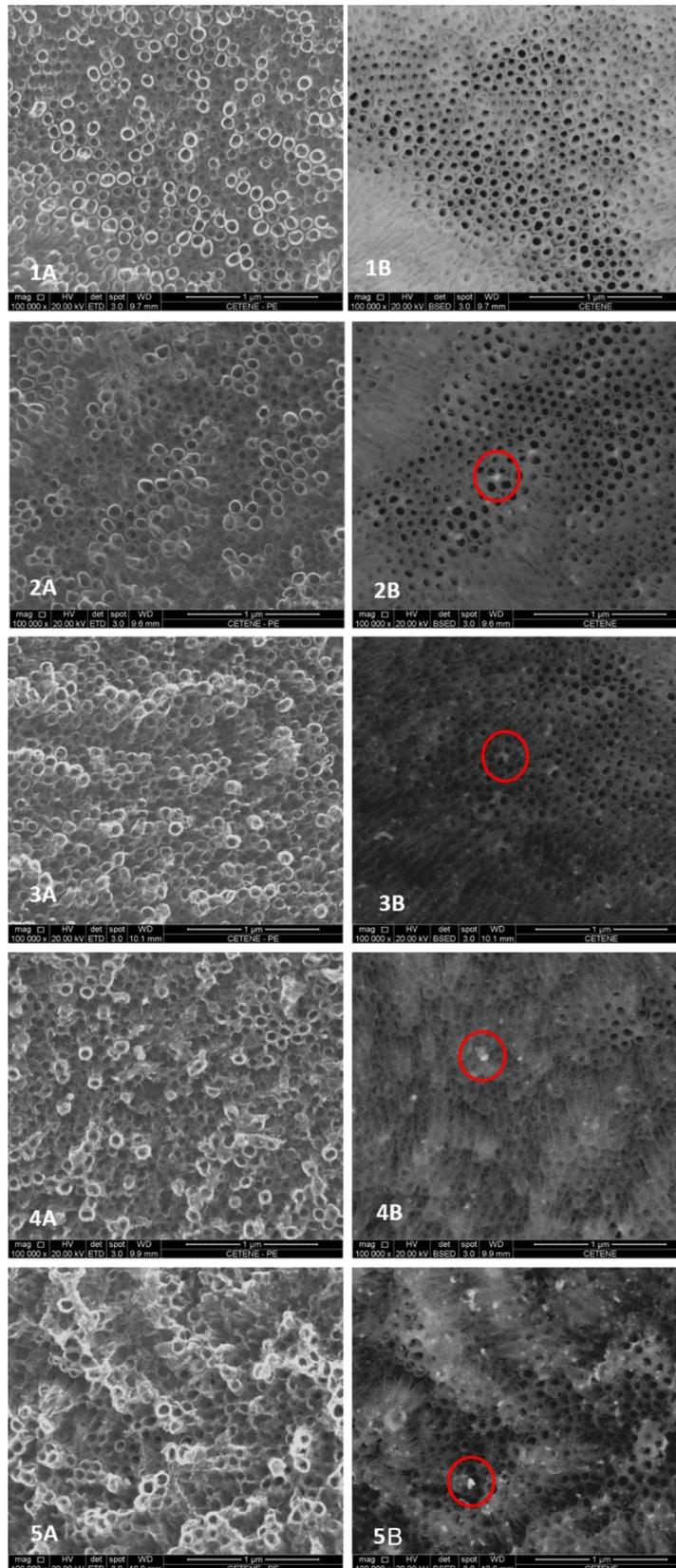
Tabela 1 – Condições dos diferentes protocolos utilizados para padronização das amostras revestidas com Ag

	pH PAH	pH PAA	Total de <i>layers</i>
Modo 1	4,5	7,5	7
Modo 2	4,5	7,5	8
Modo 3	7,5	4,5	7
Modo 4	7,5	4,5	8

Fonte: A autora

O processo de anodização, seguido do tratamento térmico mostrou-se eficiente na síntese de NTs-TiO₂ (**Figura 16. 1A-1B**). A análise ultratrustral por MEV mostrou que este processo foi capaz de produzir uma estrutura compacta e nanoestruturada tubular homogênea de diâmetro médio de 73,8 nm. Os diferentes protocolos utilizados para impregnação da Ag sobre a superfície dos NTs-TiO₂ não alteraram esse padrão. Em todas as condições experimentais (**Tabela 1**) houve formação e impregnação de AgNPs. As imagens obtidas por MEV de elétrons retroespalhados (RE) mostraram a presença dessas AgNPs monodispersas, em sua maioria esféricas e de escala nanométrica sobre todas as superfícies (**Figura 16. 2A-5B**). No entanto, a depender do modo de preparo (1-4) houve diferenças visuais em relação ao tamanho e quantidade de AgNPs. No Modo 4, as nanopartículas formadas estão visualmente em maior quantidade, além de assumirem tamanhos irregulares e com distribuição heterogênea sob a superfície, causando inclusive o acúmulo dessas AgNPs em alguns pontos da amostra (**Figura 16. 5B**).

Figura 16 – Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag por diferentes protocolos e reduzidos 12h por luz UV

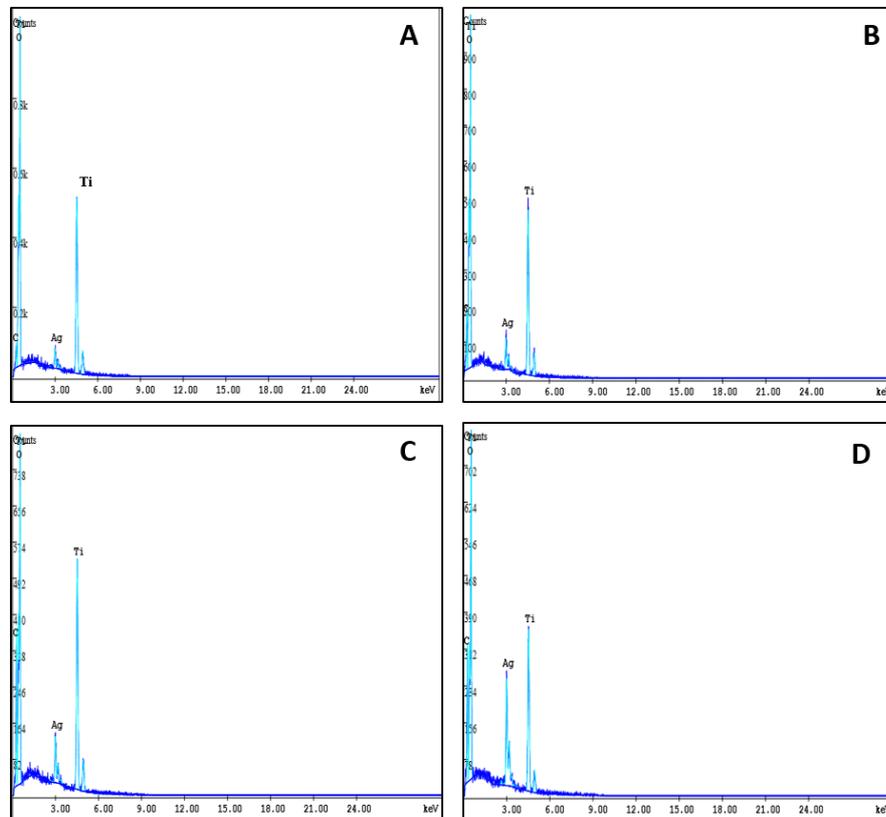


Fonte: A autora

Legenda: Legenda: Imagens de MEV (coluna esquerda) e de elétrons retroespalhados (RE, coluna direita), das amostras de NTs-TiO₂ sem revestimento (1A – 1B) e produzidas pelo Modo-1 (2A – 2B); Modo 2 (3A – 3B); Modo 3 (4A – 4B); Modo 4 (5A – 5B). As marcações destacam as nanopartículas de prata. Barra: 1μm.

A caracterização das amostras em relação à sua composição química, foi feita por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Nesta metodologia, à medida que uma sonda de elétrons varre a amostra, raios-X característicos são emitidos e medidos. Cada espectro EDS registrado é mapeado para uma posição específica na amostra. A posição dos picos no espectro identifica o elemento, enquanto a intensidade do sinal corresponde à concentração do elemento. Independentemente do modo de preparo das partículas sobre os NTs-TiO₂, os espectros gerados pelo EDS mostram a presença dos picos relativos a presença de titânio (Ti) e de prata (Ag) sem a presença de contaminantes. (Figura 17).

Figura 17 – Espectros de EDS de nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag por diferentes protocolos



Fonte: A autora

Legenda: Espectros das amostras produzidas pelo (A) Modo-1; (B) Modo 2; (C) Modo 3; (D) Modo 4.

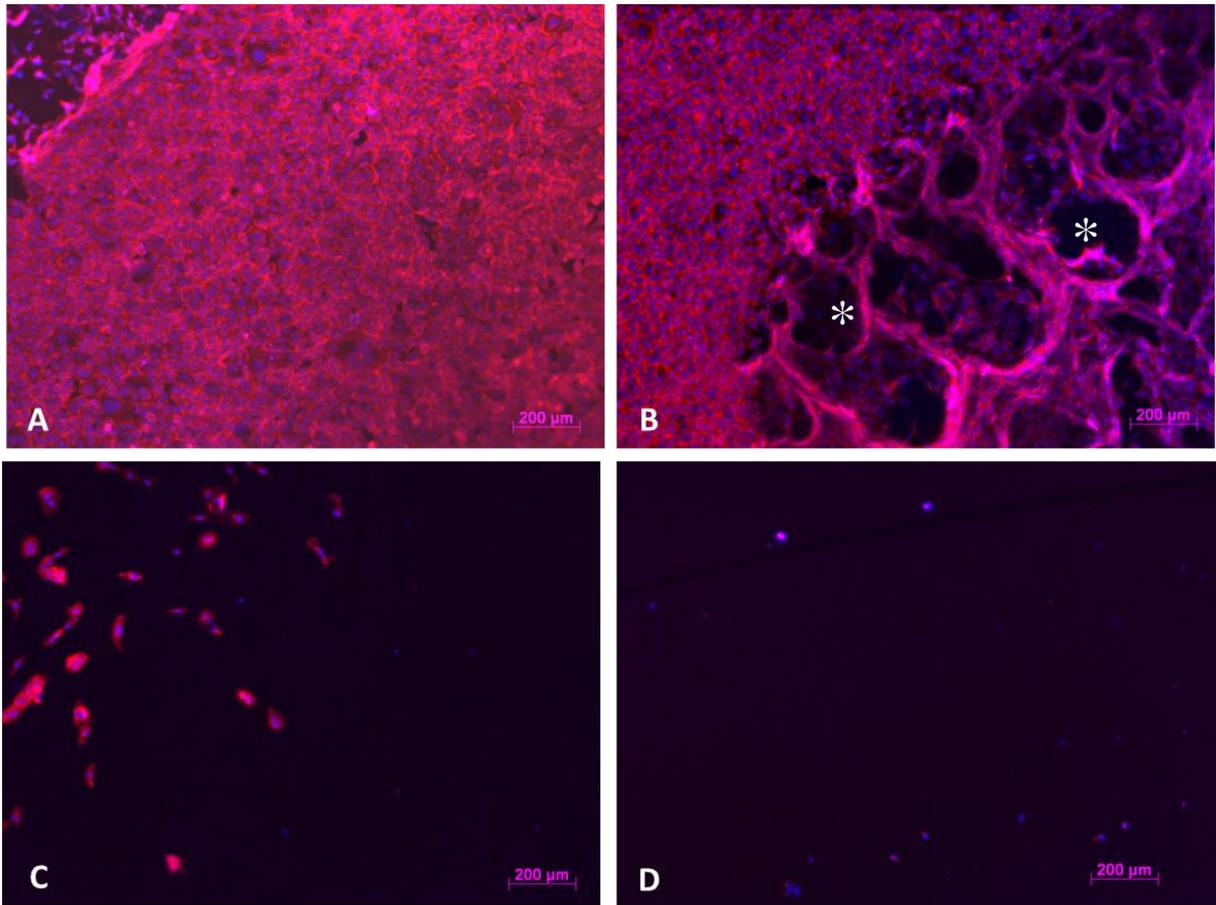
Para avaliar quais dos modos de síntese e impregnação da prata sobre a superfície dos NTs-TiO₂ era mais favorável a adesão celular, nós realizamos um ensaio piloto de citocompatibilidade sobre estas superfícies. Para este teste, células HOS foram cultivadas por 24 horas sobre os NTs-TiO₂ modificados. Após este período as células aderentes foram incubadas com sondas fluorescentes, rodamina-faloidina e DAPI para identificação dos filamentos de actina e do núcleo, respectivamente. As imagens obtidas por microscopia de

fluorescência mostraram que as amostras do Modo-1 e Modo-2 de modificação dos nanotubos favoreceram a adesão celular (**Figura 18A-B**) e a rápida colonização destes substratos. Após 24 horas de cultivo, uma monocamada celular com pouco espaço entre as células já podia ser observada. Nestas superfícies, as células assumiram forma fusiforme à poligonal com acúmulo de actina em pontos focais célula-célula e célula-substrato. Interessantemente, em algumas regiões do modo 2, as células assumiram uma estrutura concêntrica altamente organizada, semelhante a organização celular no tecido ósseo. Por outro lado, poucas células puderam ser observadas sobre as superfícies 3 e 4 (**Figura 18C-D**). Além de não favorecer a adesão estas superfícies provavelmente foram citotóxicas para as células, uma vez que as poucas células, aderidas a estas superfícies, apresentavam encurtamento do corpo celular e conseqüentemente dos filamentos de actina, principalmente no modo 4 de preparo. Sinais de fragmentação do núcleo, indicativos de morte celular, também puderam ser observados.

Levando em consideração o conjunto de resultados alcançados, o Modo 2 foi escolhido como modelo para produção das amostras revestidas por prata. Além de ter possibilitado a produção de uma amostra revestida com filmes finos de PAH/PAA e AgNPs impregnadas eficientemente em sua superfície, as amostras produzidas por este modo favoreceram a adesão e uma maior organização das células HOS sobre o substrato como observado nas imagens de fluorescência. Este protocolo também foi o único que apresentou AgNPs no estado iônico, característica importante para a atividade bactericida, como revelado pelas análises de DRX. Os difratogramas obtidos identificaram reflexões referentes à fase anatase do titânio e do TiO_2 de acordo com as fichas 21-1272 e 44-1294, respectivamente. Os 4 tipos de amostras mostraram a presença de prata em sua forma iônica (Ag^+) apenas no Modo 2. Para os demais modos, características para Ag (0) foram identificadas nas reflexões de Bragg de acordo com a ficha 2-1098 do software Search-Match (dados não mostrados)

O protocolo desenvolvido no modo 2 também será utilizado para adsorção da lectin BIL às superfícies dos NTs- TiO_2 .

Figura 18 – Avaliação da adesão das células HOS sobre as amostras impregnadas com Ag por diferentes protocolos.



Fonte: A autora

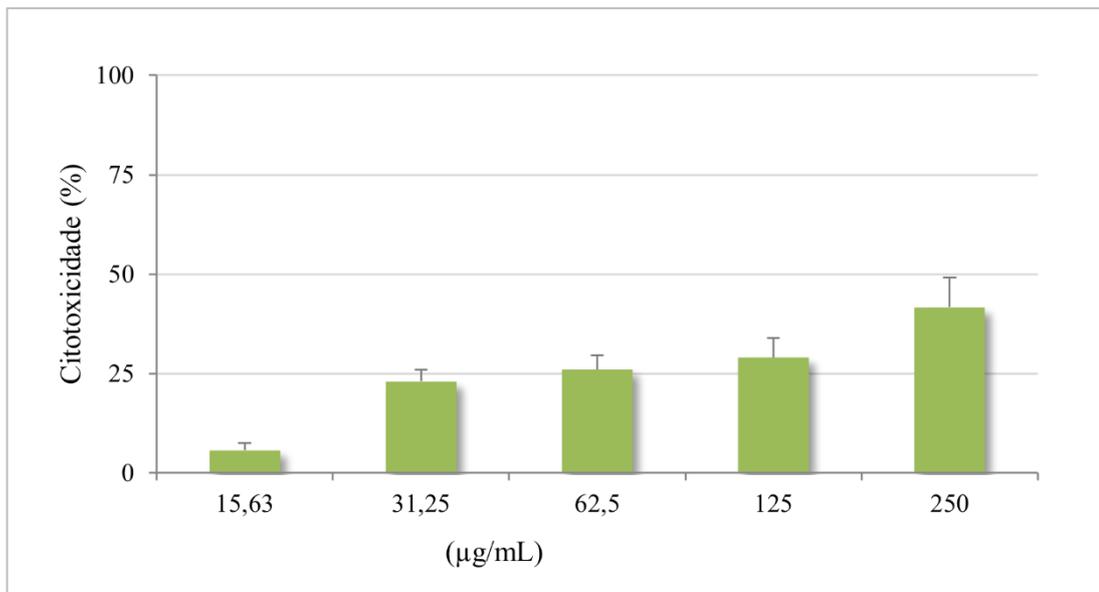
Legenda: Células HOS cultivados por 24h sobre amostras produzidas pelo (A) Modo-1; (B) Modo 2; (C) Modo 3 e (D) Modo 4. As células foram marcadas com rodamina-faloidina (canal vermelho) e DAPI (canal azul), para visualização dos filamentos de actina e do núcleo, respectivamente. Barra: 200μm. Nota: Em (A) a presença de uma monocamada contínua sem aparente organização, enquanto em (B) podemos observar a formação de estruturas em semelhantes a trabéculas ósseas (*).

5.2 Padronização das amostras revestidas com BIL

A fim de determinar a faixa concentração da lectina a ser aplicada sobre os NTs-TiO₂ torna-se necessário determinar o potencial citotóxico desta proteína sobre as células HOS. Desta forma, nós realizamos um ensaio piloto para avaliar a citotoxicidade da lectina de *Bothropus leucurus* (BIL) isolada sobre as células HOS. Para isso as células foram cultivadas por 7 dias (tempo máximo proposto para os testes *in vitro*), na ausência ou presença de diversas concentrações de BIL (15,63 e 250 μg/mL). Nenhuma das concentrações testadas apresentou citotoxicidade para células HOS acima de 50% em relação ao controle sem tratamento, no entanto o um aumento dose-dependente na citotoxicidade pode ser observada, com taxas variando

de 5,7 e 41,7 %, para a menor e maior concentração testada, respectivamente (**Gráfico 1**). A IC_{50} , concentração que inibe a viabilidade celular em 50%, foi estimada em $253,2 \pm 16,99 \mu\text{g/mL}$. Desta forma, escolhemos trabalhar com as concentrações de BIL de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de forma a garantir uma boa quantidade de proteína a ser adsorvida sob a superfície dos NTs- TiO_2 , em uma concentração da lectina abaixo do valor da IC_{50} .

Gráfico 1 – Citotoxicidade da lectina BIL sobre células HOS



Fonte: A autora

Legenda: Efeito citotóxico da lectina BIL sobre osteoblastos, após 7 dias de incubação. O controle, células HOS sem tratamento, foi considerado como tendo 100% de viabilidade. As barras representam a média \pm DP de dois experimentos em triplicata.

5.3 Síntese e Caracterização das superfícies modificadas de TiO_2 pós-padronização

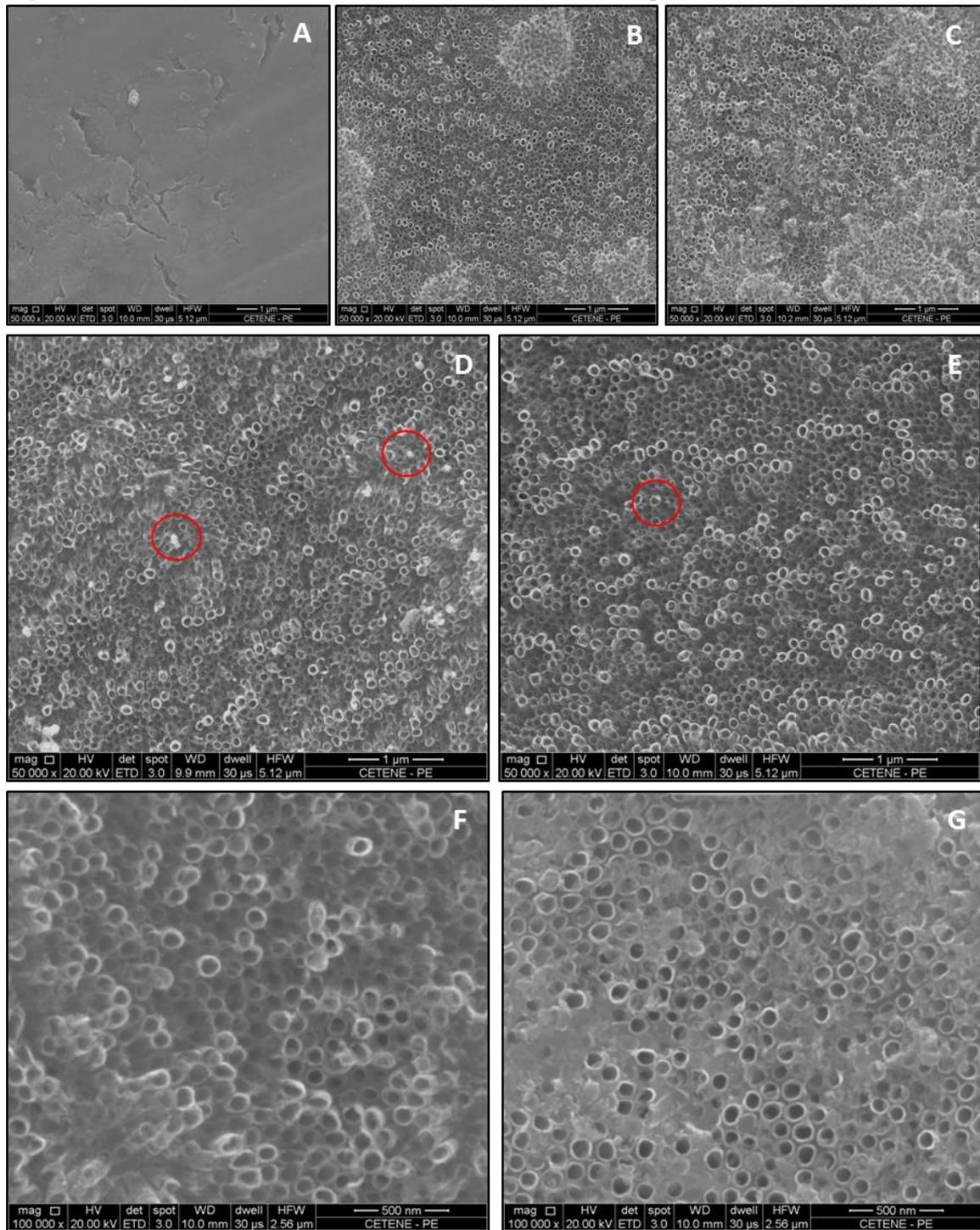
Tendo em vista que as nossas condições de padronização se mostraram eficientes na modificação dos NTs- TiO_2 , promovendo a adesão das células HOS, esses parâmetros foram utilizados para uma caracterização mais detalhada das diferentes superfícies. O processo de *LbL*, utilizado para a deposição dos polímeros PAH e PAA, foi capaz de formar filmes ultrafinos que não prejudicaram a morfologia dos nanotubos, nem a incorporação de prata à superfície (**Figura 19C**). Para a obtenção das AgNPs, foram utilizadas duas concentrações de acetato de prata, 7 e 10 mM. Nas imagens obtidas por MEV é possível notar que visualmente as amostras que foram tratadas com 7mM de acetato de prata, mostraram um maior número de AgNPs depositadas em sua superfície quando comparadas às recobertas com 10mM. Para as duas concentrações de acetato de prata, as nanopartículas mostraram uma distribuição

uniforme, apresentando-se como partículas monodispersas sobre as superfícies, sem interferir com a morfologia e estrutura dos nanotubos (**Figura 19D-E**).

Para adsorção da BIL nos NTs-TiO₂, utilizamos duas metodologias diferentes. A primeira técnica utilizada foi a do *LbL*, com deposição dos polímeros PAH/ PAA, conforme protocolo adotado (Modo 2, Tabela 1) e concentrações finais da lectina de 100 e 200 µg/mL, impregnadas por *dip coating*. A segunda metodologia utilizada foi a de *spin coating*. Por essa técnica não ocorre a deposição prévia do polímero e a lectina é adsorvida diretamente sobre a matriz de NTs-TiO₂. De forma semelhante às condições de padronização, as análises por MEV demonstraram que a deposição da BIL, qualquer que tenha sido a técnica utilizada, não alterou a morfologia dos nanotubos, sugerindo a formação de um filme fino da lectina sobre estas amostras, (**Figura 19F-G**).

Para comprovar, a natureza química e pureza das amostras de NTs-TiO₂, foi realizada a análise de EDS. Como era de se esperar, a amostra de titânio comercialmente puro, apresentou essencialmente apenas os picos correspondentes ao Ti. Já nas amostras anodizadas e revestidas com PAH/ PAA pode-se observar os picos correspondentes ao titânio (Ti), oxigênio (O) e carbono (C), sendo este último o principal componente químico dos polímeros. Além destas moléculas um pico adicional pode ser observado nas amostras impregnadas por Ag, confirmando sua incorporação à superfície da amostra. Nas amostras revestidas por BIL, a presença de picos correspondentes ao sódio (Na), cloro (Cl) e fósforo (P) – componentes majoritários do PBS, utilizado para diluir a lectina, também puderam ser observados (**Figura 20**).

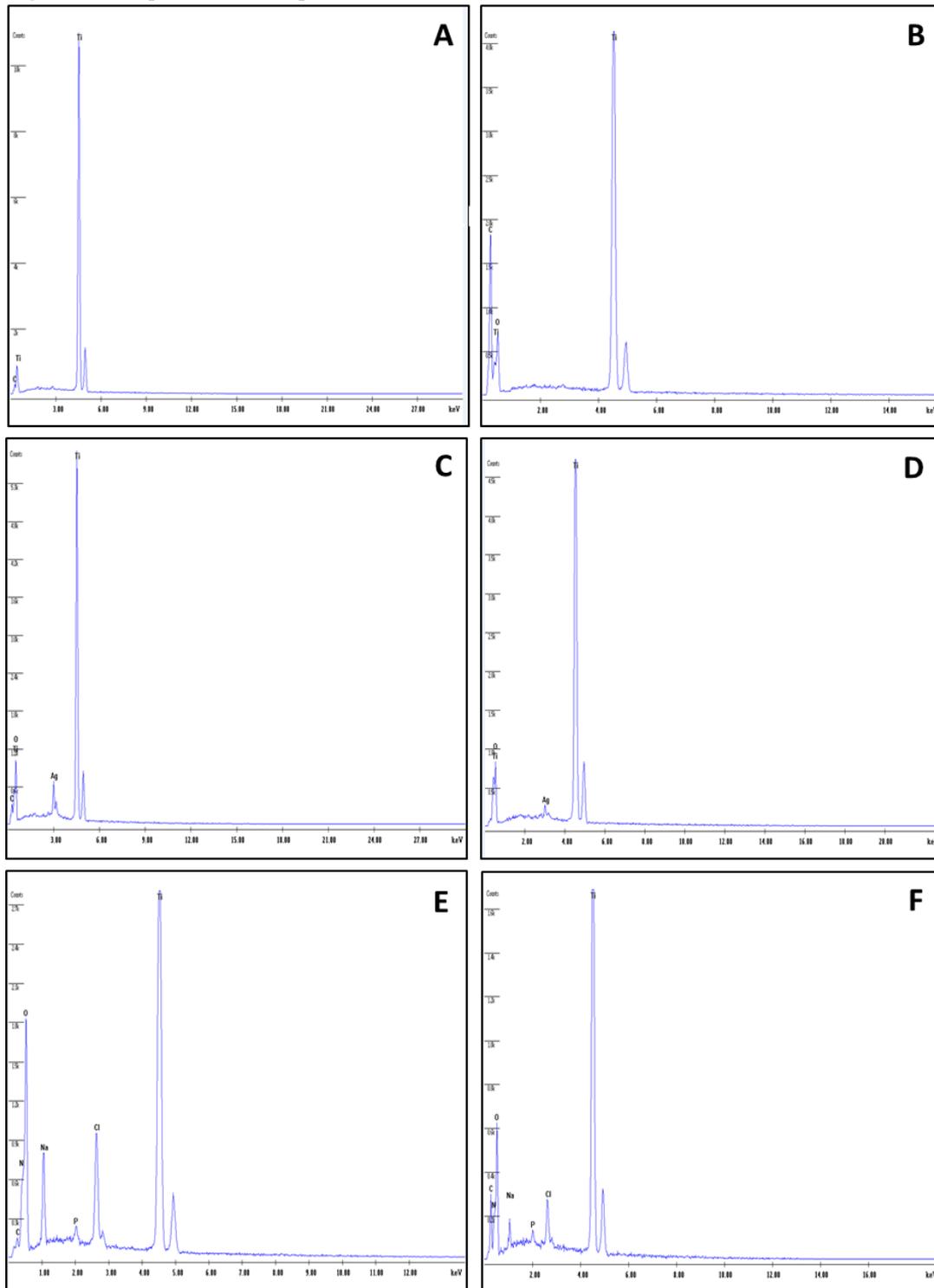
Figura 19 – Amostras de titânio com diferentes tratamentos sobre a superfície



Fonte: A autora

Legenda: (A) Titânio comercialmente puro; (B) Nanotubos de TiO_2 ; (C) Nanotubos de TiO_2 revestidos com PAH/PAA; (D) Nanotubos de TiO_2 com AgNPs, 7mM; (E) Nanotubos de TiO_2 com AgNPs, 10 mM. Barra: 1µm.(F) Nanotubos de TiO_2 impregnados com BIL, 200µg/mL por *dip coating*; (G) Nanotubos de TiO_2 impregnados com BIL, 200µg/mL por *spin coating*, Barra: 500nm. As setas destacam as nanopartículas de Ag.

Figura 20 – Espectros de EDS para diferentes amostras de titânio



Fonte: A autora

Legenda: (A) Titânio comercialmente puro; (B) Nanotubos de TiO_2 revestidos com PAH/PAA; (C) Nanotubos de TiO_2 com AgNPs, 7mM; (D) Nanotubos de TiO_2 AgNPs, 10 mM; (E) Nanotubos de TiO_2 impregnados com BIL, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por *dip coating*; (F) Nanotubos de TiO_2 impregnados com BIL, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por *spin coating*.

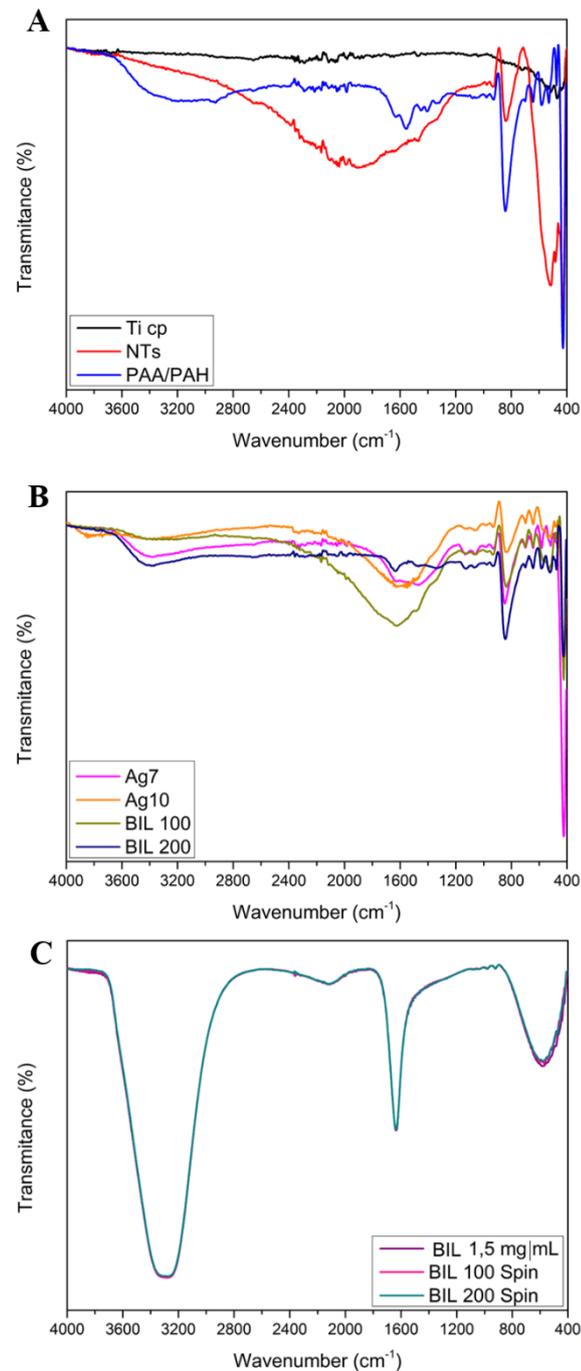
Para uma confirmação mais detalhada da incorporação dos diferentes elementos usados na modificação da superfície do TiO_2 , as amostras foram submetidas à análise pela técnica de FTIR por ATR. Nossos resultados mostraram que o titânio puro (Ticp), apresentou somente uma pequena absorção na região de 500 cm^{-1} , relacionada às ligações naturais do metal. As amostras anodizadas (NTs- TiO_2), por sua vez, apresentaram a formação de outras regiões de absorção. Os picos observados entre 400 e 1000 cm^{-1} correspondem à região de impressão digital e são relacionados aos estiramentos da ligação Ti-OH. Por isso, este pico deve ser observado em todas as amostras que contém NT- TiO_2 , com maior ou menor intensidade dependendo da efetividade da modificação superficial. No grupo NT- TiO_2 foram observados picos em 1063 cm^{-1} , 1125 cm^{-1} , 1324 cm^{-1} e 1462 cm^{-1} , sendo referentes aos estiramentos dos grupos carboxilato, ligação C-N e os dois últimos aos estiramentos da ligação C-O do ácido carboxílico, indicando provavelmente resíduos do processo de anodização. Esses mesmos grupos foram encontrados com maior intensidade no espectro da amostra PAH/PAA, sendo relativos à deposição dos polímeros pelo método *Layer by layer*. Os picos em 1404 cm^{-1} (estiramento antissimétrico dos grupos CO^{32-} e HCO^{23-}), 1554 cm^{-1} (flexão simétrica da ligação N-H), 1633 cm^{-1} (flexão assimétrica da ligação N-H) e 2930 cm^{-1} (estiramento da ligação N-H) reforçam essa teoria. A grande banda de absorção observada em torno de 3300 cm^{-1} é relativa ao estiramento da ligação O-H, já esperada nas amostras contendo PAH/PAA, uma vez que foram preparadas após imersão em solução aquosa (**Figura 21A**).

Como as amostras de PAA/PAH também foram impregnadas com AgNPs ou BIL, a maioria dos picos destacados anteriormente foram observados, com leve variação na posição de algumas bandas de absorção, conforme figura 21B. A ausência dos picos em 1324 cm^{-1} para as amostras contendo AgNPs e dos picos em 1404 cm^{-1} e 1554 cm^{-1} para todas as amostras analisadas podem ser um indicativo de que os grupos funcionais representados por tais bandas de absorção (C-N, C-O e N-H, respectivamente) estão envolvidos na ligação química dos polímeros PAA/PAH com a prata e a lectina impregnadas por *dip coating*.

A análise por FTIR das amostras revestidas com diferentes concentrações da lectina BIL por *spin coating* (BIL 100Sc e BIL200SC) permitem observar que este método foi mais eficiente para realizar a adsorção da lectina, uma vez que o perfil de bandas apresentado em BIL100SC e BIL200SC coincidem com as análises da lectina BIL isolada (BIL 1,5 mg/mL). As bandas identificadas correspondem ao estiramento da ligação O-H em 3290 cm^{-1} , à presença do sal de amina em 2123 cm^{-1} , e ao estiramento vibracional da ligação C=O em 1636 cm^{-1} . A presença da ligação C-Cl, identificada em 579 cm^{-1} , pode estar relacionada ao método de preparação e

diluição da lectina, cujas soluções base possuem cloreto. Também foram observados pequenos picos em 1035 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} , os quais estão relacionados às ligações P-O e P-C. Já os picos em 980 cm^{-1} e 921 cm^{-1} são referentes à ligação C-H fora do plano (**Figura 21C**).

Figura 21 –FTIR dos diferentes grupos de amostras



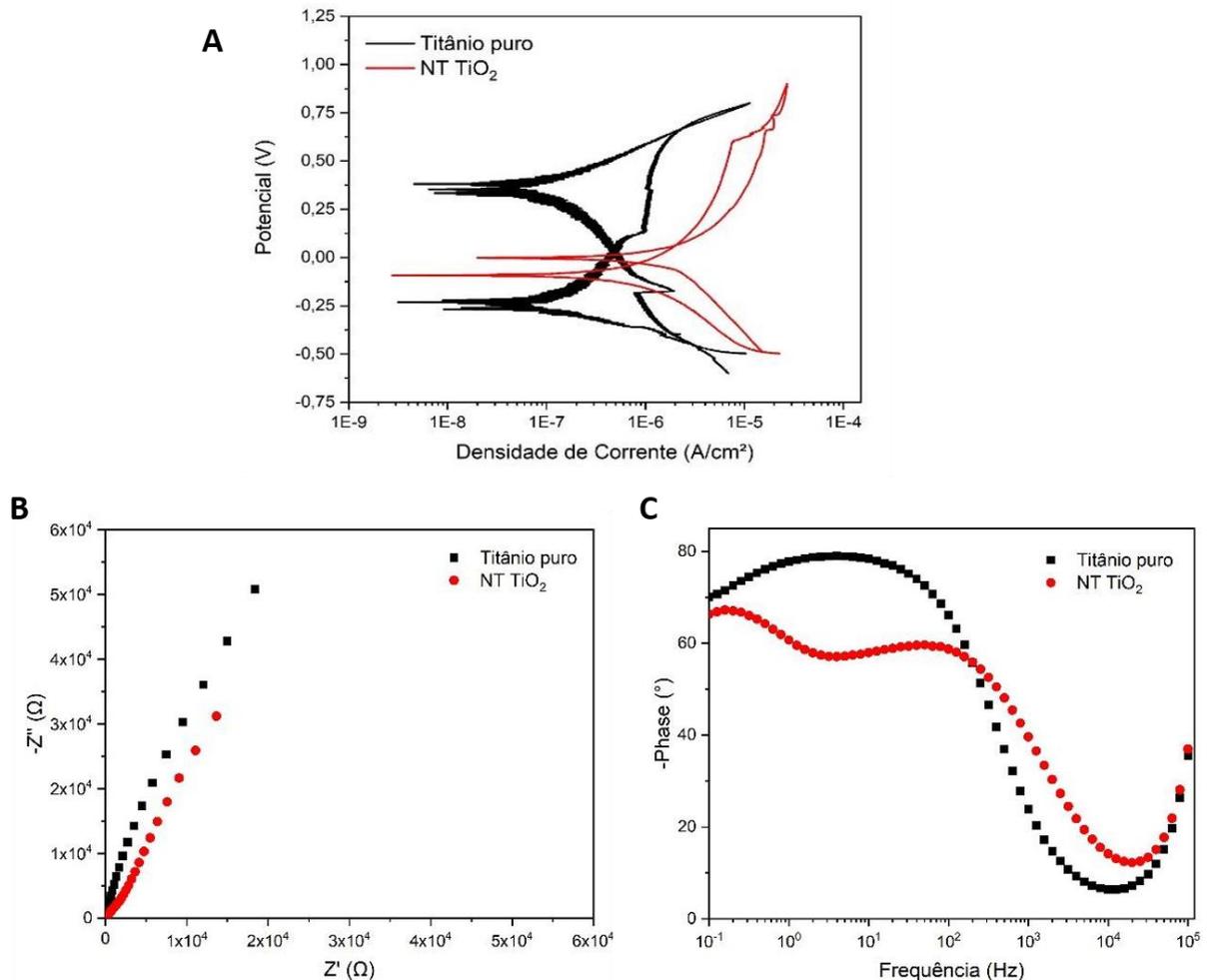
Fonte: A autora

Legenda: Espectroscopia de FTIR para amostras de (A) Titânio puro, nanotubos de TiO_2 e nanotubos de TiO_2 recobertos com PAA/PAH; (B) Nanotubos de TiO_2 recobertos com diferentes concentrações de prata e de BIL por *dip coating*; (C) Lectina BIL livre e Nanotubos de TiO_2 recobertos com diferentes concentrações de BIL por *spin coating*.

Para averiguarmos a eficiência da incorporação das soluções sobre NT-TiO₂ foram realizadas também ensaios de medidas eletroquímicas. As análises de polarização cíclica foram realizadas em meio contendo uma solução de fluido corporal simulado (FCS) 1,5, de acordo com o método de Kokubo (2006).

Inicialmente os NTs-TiO₂ e as placas de titânio puro foram avaliadas isoladamente por polarização cíclica (**Figura 22A**). As amostras NTs-TiO₂ mostraram um aumento da corrente de corrosão devido ao aumento da área e conseqüentemente das reações superficiais. As curvas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) confirmaram a maior resistência à corrosão da placa de titânio em relação ao NTs-TiO₂ (**Figura 22B**). Além disso, indicaram a presença de diferentes mecanismos de transportes de carga na placa de titânio e nos NTs-TiO₂ (**Figura 22C**). Para os NTs-TiO₂ foram encontradas duas interfaces de transferência de carga, a primeira associada às maiores frequências e transportadores mais rápidos, e a segunda em menores frequências indicando transportes mais lentos. Assim, os NTs-TiO₂ atuam como transportadores rápidos de elétrons, formando uma interface de acúmulo de carga, enquanto as trocas de carga entre superfície e solução estão associadas aos transportes lentos. Como as placas de titânio não possuem transportadores rápidos de nanotubos, apresentam apenas a interface superficial com transferências mais lentas (menores frequências).

Figura 22 – Curvas de polarização cíclica e impedância para amostras de titânio puro e nanotubos de TiO₂

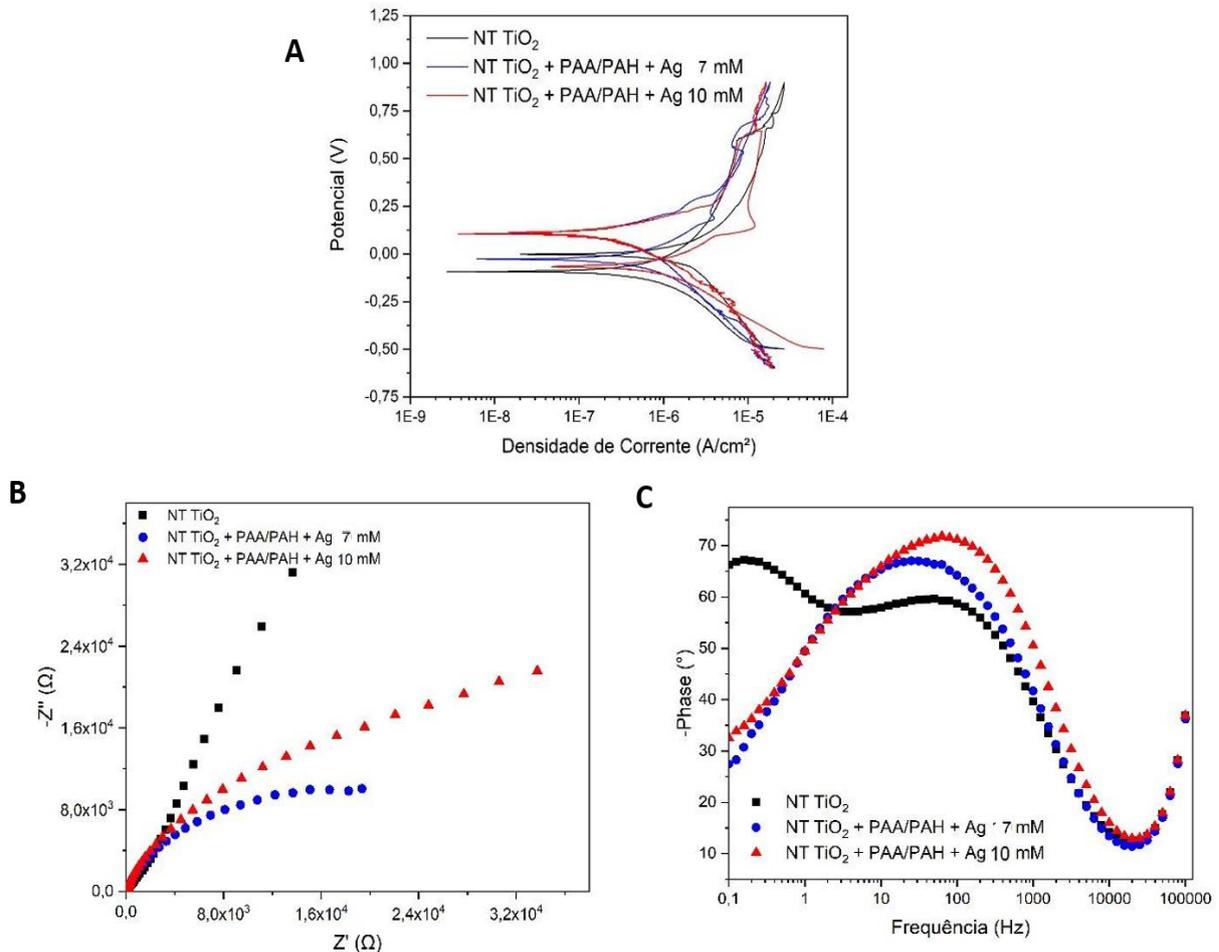


Fonte: A autora

Legenda: (A) Curva de polarização cíclica; (B) Gráfico de Nyquist e (C) Gráfico de Bode para amostras de titânio puro (em preto) e NT- TiO₂ (em vermelho).

A análise das amostras de NTs-TiO₂ contendo AgNPs em diferentes concentrações (**Figura 23A**) mostrou uma relação dose-dependente com o aumento da resistência à corrosão devido à capacidade redutora da Ag. A região passiva do gráfico mostrou comportamento mais uniforme para as amostras com maiores concentrações de Ag, indicando um filme com melhores propriedades físicas. Estes dados são corroborados pelo gráfico de Nyquist que mostrou a maior resistência à corrosão das amostras de NTs-TiO₂ recobertas com maior concentração de Ag (**Figura 23B**). As curvas bode indicam uma possível cobertura e proteção dos nanotubos contra corrosão devido ao aparecimento de únicos transportadores em frequências maiores (**Figura 23C**).

Figura 23 – Curvas de polarização cíclica e impedância para amostras de nanotubos de TiO_2 e recobertas com Ag em diferentes concentrações.

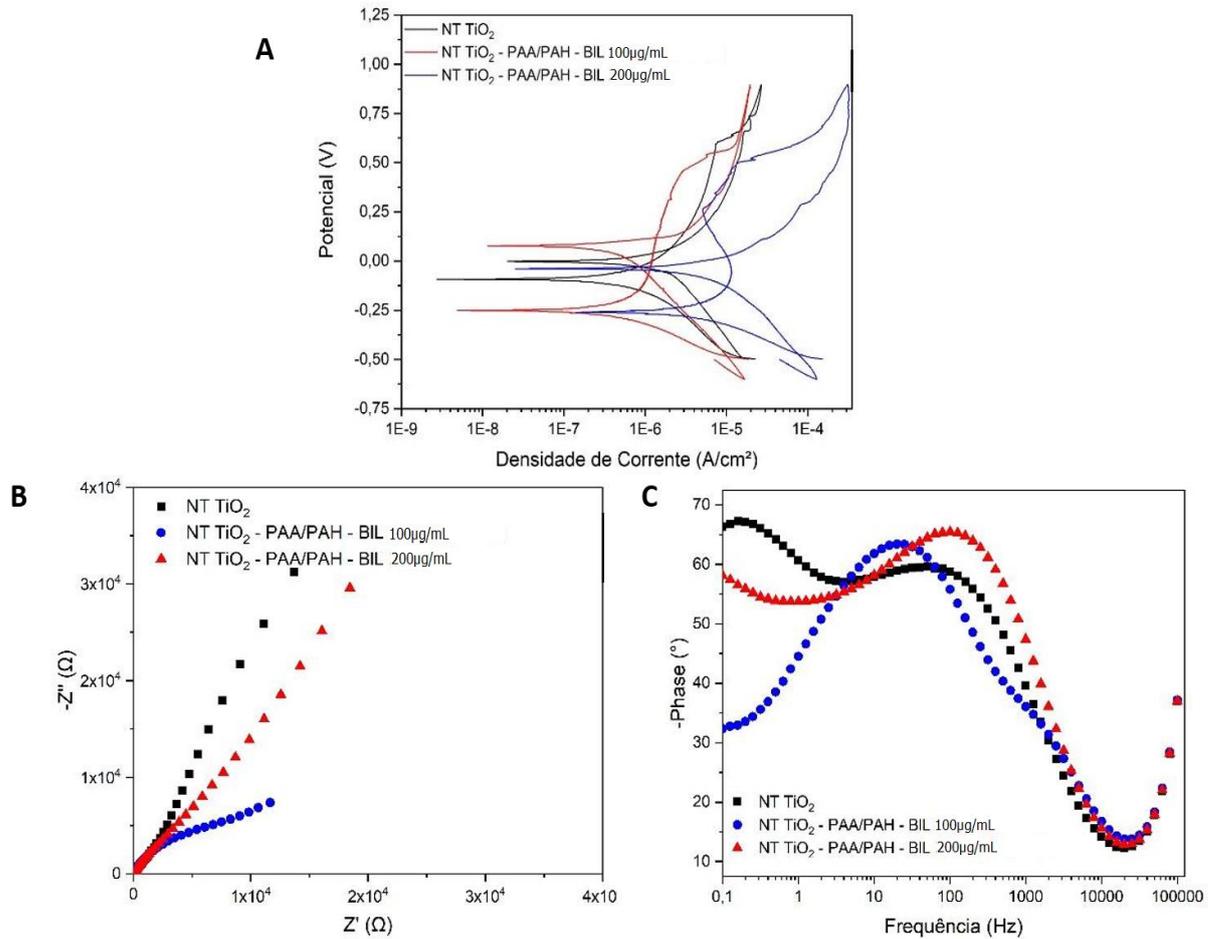


Fonte: A autora

Legenda: (A) Curva de polarização cíclica; (B) Gráfico de Nyquist e (C) Gráfico de Bode para amostras NT- TiO_2 (em preto), e revestidas com AgNPs 7mM (em azul) e com AgNPs 10mM (em vermelho).

As amostras de NT foram recobertas com a lectina BIL em diferentes concentrações pela metodologia *dip coating*. Por possuir capacidade de interação, a lectina BIL promoveu reações com o meio FCS, solução utilizada e que simula a composição dos fluidos corporais. Dessa forma, quando em contato com a solução de FCS 1,5, parte da lectina é inicialmente utilizada para reagir com o FCS, e o restante da lectina fica na superfície dos nanotubos de TiO_2 e forma uma fina camada protetora. Portanto, as amostras com BIL $100\mu\text{g}/\text{mL}$ mostraram menor resistência à corrosão de todas, enquanto a amostra de maior concentração, BIL $200\mu\text{g}/\text{mL}$, aumentou a resistência à corrosão em relação aos NT- TiO_2 (**Figura 24A**). De forma similar, o aumento da corrosão proporcional à concentração da BIL também pode ser demonstrado pela curva Nyquist (**Figura 24B**). A curva de Bode, reforça os dados obtidos indicando um recobrimento dos nanotubos pela lectina (**Figura 24C**).

Figura 24 – Curvas de polarização cíclica e impedância para amostras de nanotubos de TiO_2 e recobertas com diferentes concentrações da lectina BIL por *dip coating*

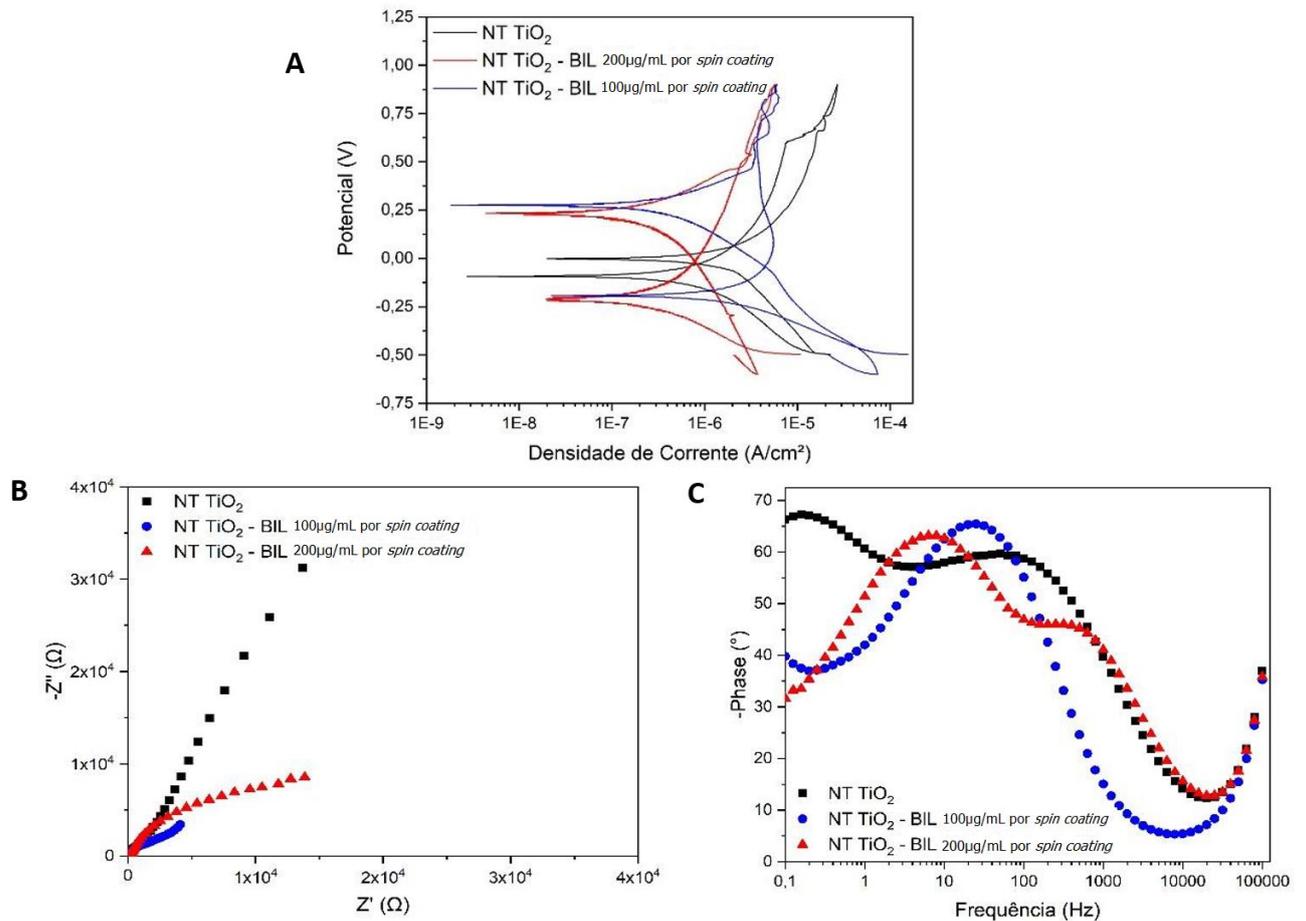


Fonte: A autora

Legenda: (A) Curva de polarização cíclica; (B) Gráfico de Nyquist e (C) Gráfico de Bode para amostras de nanotubos de TiO_2 (em preto) e revestidas com BIL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (em azul) e com BIL 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (em vermelho) por *dip coating*.

Um comportamento similar ao grupo BIL *dip coating*, foi encontrado para NTs- TiO_2 recoberta com BIL200 por *spin coating* com uma relação diretamente proporcional entre a concentração e a proteção conferida pelo filme formado pela lectina sobre os NTs- TiO_2 , e consequentemente maior resistência à corrosão. O potencial de formação do filme passivo não foi alterado, indicando que os diferentes filmes possuem características similares (**Figura 25A**). O gráfico de EIS Nyquist corrobora com estes dados (**Figura 25B**). Curiosamente, a amostra de menor concentração mostrou um melhor recobrimento pelo aparecimento de únicos transportadores na curva Bode (**Figura 25C**).

Figura 25 – Curvas de polarização cíclica e impedância para amostras de nanotubos de TiO₂ e recobertas com diferentes concentrações da lectina BIL por *spin coating*



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (A) Curva de polarização cíclica; (B) Gráfico de Nyquist e (C) Gráfico de Bode para amostras de nanotubos de TiO₂ (em preto) e revestidas com BIL 100µg/mL (em azul) e com BIL 200µg/mL (em vermelho) por *spin coating*.

Analisando os parâmetros de cada processo de deposição da lectina, podemos indicar que o sistema mais eficiente para resistir às reações de corrosão foi associado ao NT-TiO₂-BIL 200 µg/ml por *spin coating*. O processo mostrou ser mais eficaz na cobertura e proteção dos nanotubos das reações de dissolução superficial.

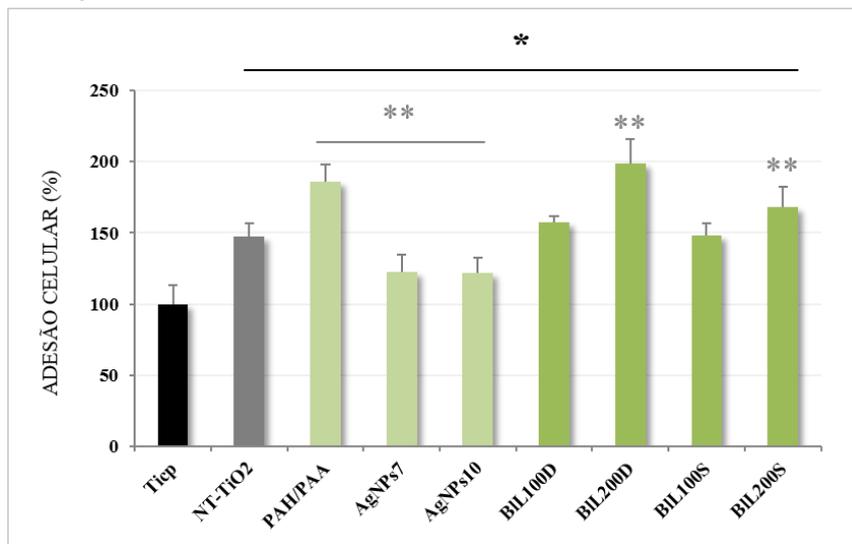
5.4 Avaliação da Biocompatibilidade

Para os testes de biocompatibilidade foram estudados os seguintes grupos: (1) Titânio cp, (2) NTs-TiO₂ sem tratamento de superfície, (3) NTs-TiO₂+PAH/PAA (Modo 2, Tabela 1), (4) NTs-TiO₂ impregnados com Ag 7mM, (5) NT-TiO₂ impregnados com Ag 10mM, (6) NTs-TiO₂ + BIL 100µg/mL por *dip coating*, (7) NT-TiO₂ + BIL 200µg/mL por *dip coating*, (8) NT-TiO₂ + BIL a 100µg/mL por *spin coating*, (9) NT-TiO₂ + BIL a 200µg/mL por *spin coating*.

5.4.1 Avaliação da adesão celular

Para os testes de adesão, as células HOS foram levadas a interagir por 24 horas com os diferentes grupos de amostras e após esse período tiveram os filamentos de actina do citoesqueleto 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. Com as imagens obtidas por microscopia de fluorescência, foi feita a quantificação de células HOS aderidas sobre cada amostra. A média obtida de cada contagem foi comparada à média dos grupos controle. Os resultados em porcentagem, exibidos no gráfico 2, ilustram um aumento significativo da adesão celular em todas as amostras quando comparadas com o titânio puro (Ticp). No entanto, quando comparado ao grupo dos NTs-TiO₂ as respostas foram bastante distintas entre os grupos cujas superfícies foram modificadas. Os grupos TiO₂+PAH/PAA, BIL200DC e o BIL200SC tiveram um aumento significativo na porcentagem de células aderidas, quando comparadas com NT-TiO₂. Por outro lado, nos NT-TiO₂ modificados com AgNPs (7 e 10 mM) houve um decréscimo na porcentagem de células aderidas. Quando comparamos a médias entre os grupos, podemos observar que o grupo BIL200D foi o que apresentou os melhores resultados em relação à adesão celular.

Gráfico 2 – Quantificação da adesão de células HOS sobre as diferentes amostras

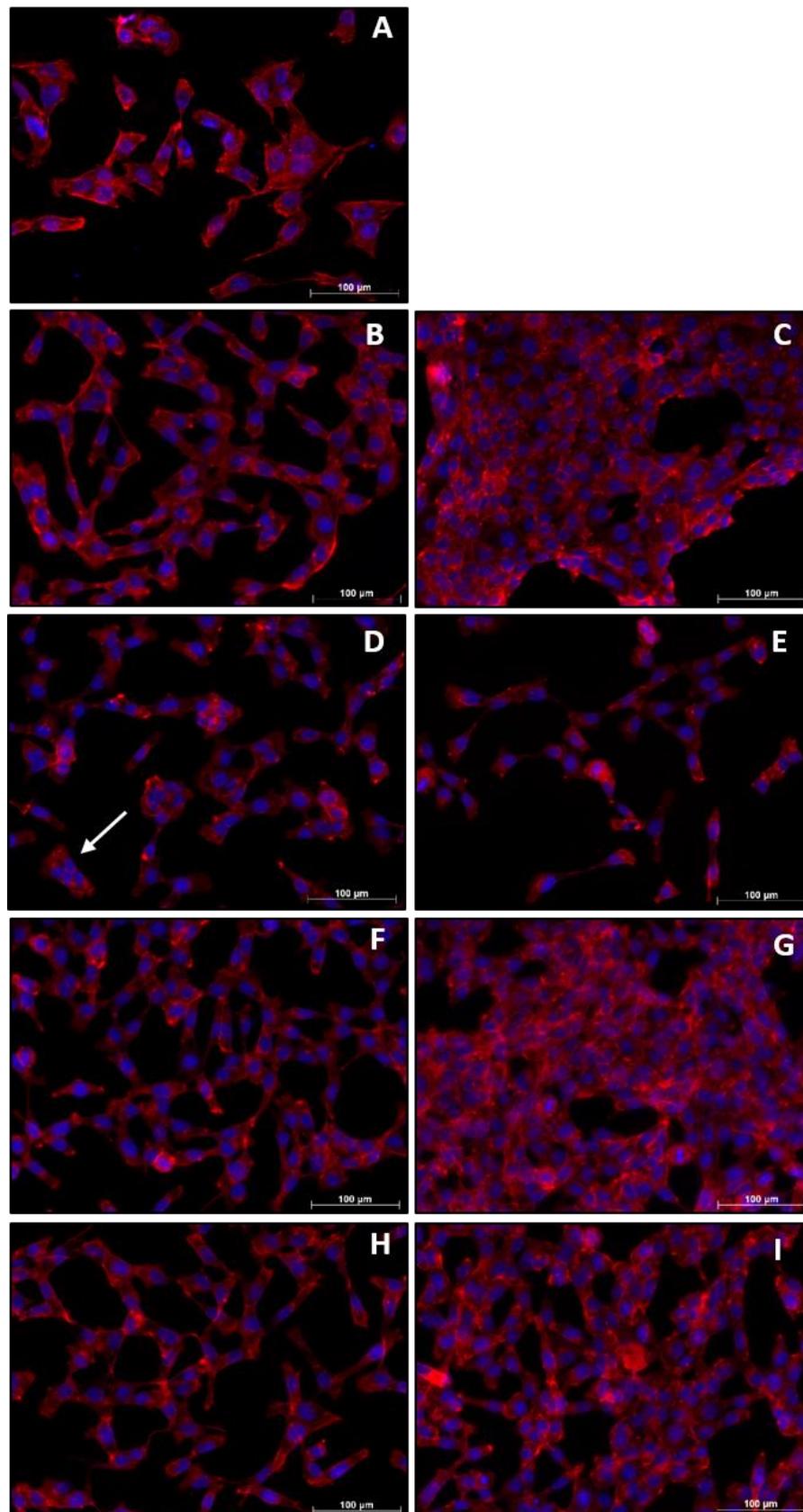


Fonte: A autora

Legenda: Adesão de células HOS sobre (Tícp) Titânio puro, (NT-TiO₂) Nanotubos de TiO₂, (PAH/PAA) Nanotubos de TiO₂ revestidos com PAH/PAA, (AgNPs7) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 7mM, (AgNPs10) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 10mM, (BIL100D) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 100µg/mL por *dip coating*, (BIL200D) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 200µg/mL por *dip coating*, (BIL100S) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 100µg/mL por *spin coating*, (BIL200S) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 200µg/mL por *spin coating*. (*) os valores foram significativos quando comparados com Tícp onde $p < 0,05$. (**) os valores foram significativos quando comparados com NT onde $p < 0,05$.

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência corroboram estes achados. O grupo Tícp apresentou poucas células HOS aderidas, em pequenos grupos isolados, com pouco contato intercelular. Os filamentos de actina estavam distribuídos pelo citoplasma, mas poucos pontos focais (locais nas extremidades das células, onde a concentração de actina favorece a adesão célula-célula, célula-substrato) foram visualizados (**Figura 26A**). O núcleo das células apresentou-se bem preservado, no entanto poucas células em divisão puderam ser observadas. Já nas demais amostras, exceto nas impregnadas com AgNPs, as células assumem forma alongada (fusiforme ou poligonal), com orientação dos filamentos de actina, e formação de monocamadas nos casos do grupo PAH/PAA e no grupo BIL200D (**Figura 26**). Esses dados mostram que estes dois últimos grupos aumentaram a citocompatibilidade dos NTs-TiO₂ favorecendo a adesão e rápida colonização celular nas primeiras 24 horas de cultivo e, provavelmente induzindo a proliferação e osteogênese. Por outro lado, a deposição da prata sobre a superfície dos NTs-TiO₂ causou desorganização dos filamentos de actina e provavelmente inibição da divisão celular, visto que algumas células apresentavam múltiplos núcleos (**Figura 26D**, seta).

Figura 26 – Avaliação da adesão de células HOS cultivadas sobre as diferentes amostras



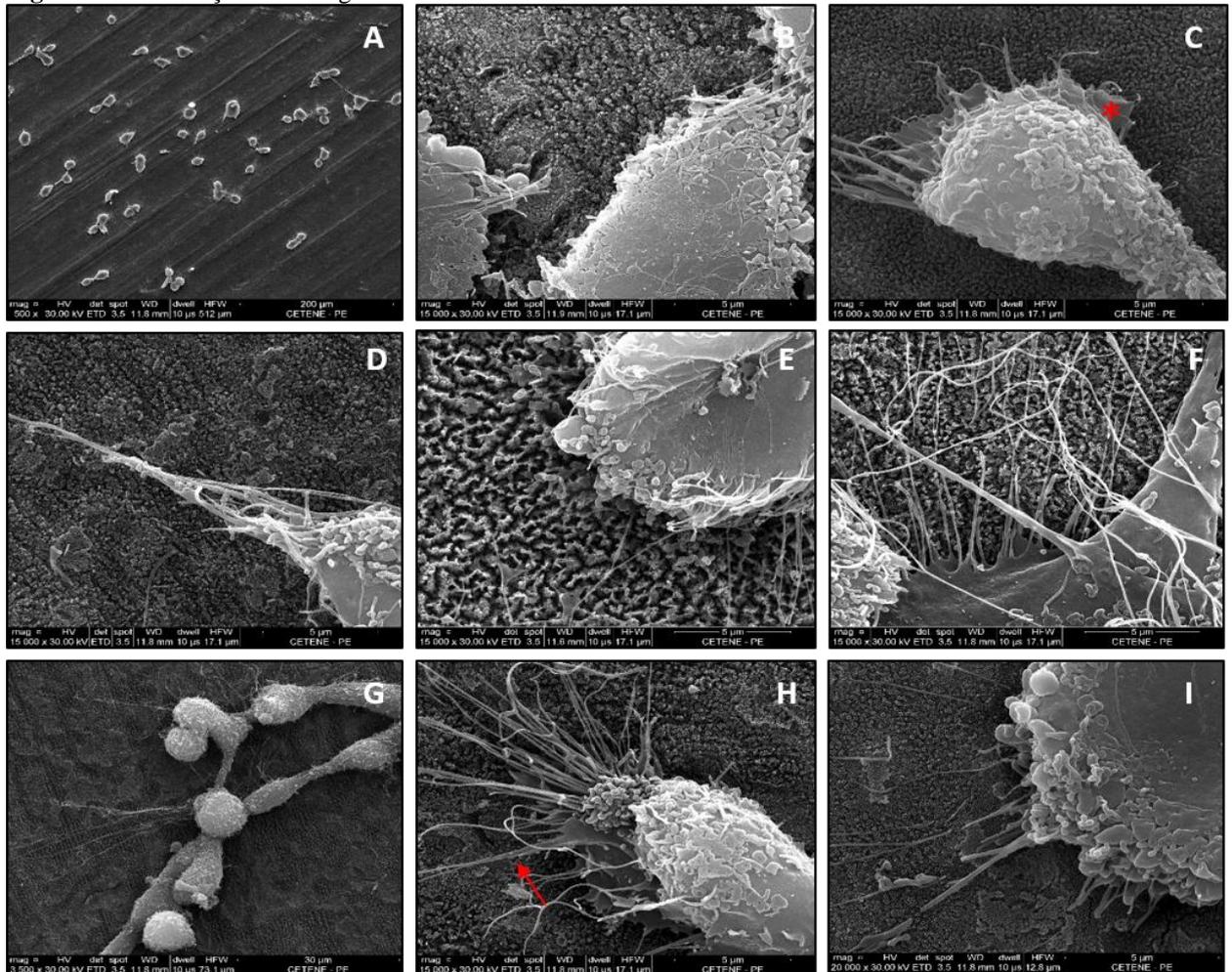
Fonte: A autora

Legenda: Imagens de fluorescência mostram os filamentos de actina (vermelho) e núcleo (azul) de células HOS cultivadas por 24h sobre (A) Titânio puro, (B) Nanotubos de TiO_2 , (C) Nanotubos de TiO_2 revestidos com PAH/PAA, (D) Nanotubos de TiO_2 impregnados com Ag 7mM, (E) Nanotubos de TiO_2 impregnados com Ag 10mM, (F) Nanotubos de TiO_2 impregnados com BIL a $100\mu\text{g/mL}$ por *dip coating*, (G) Nanotubos de TiO_2 impregnados com BIL a $200\mu\text{g/mL}$ por *dip coating*, (H) Nanotubos de TiO_2 impregnados com BIL a $100\mu\text{g/mL}$ por *spin coating*, (I) Nanotubos de TiO_2 impregnados com BIL a $200\mu\text{g/mL}$ por *spin coating*. A seta destaca célula HOS com múltiplos núcleos. Barra: $100\mu\text{m}$

5.4.2 Avaliação da morfológica das células

A análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura também foi utilizada para avaliar o efeito do tratamento da superfície dos NTs-TiO₂ sobre a morfologia das células HOS aderidas após de 24 horas de cultivo. Como esperado a superfície de Ticp mostrou poucas células isoladas aderidas de aspecto fusiforme, em sua maioria (**Figura 27A**). As superfícies de NTs-TiO₂, exceto as impregnadas com a prata, mostraram uma mudança do padrão fusiforme (visto no grupo Ticp) para um perfil mais achatado e mais espalhado das células, nos quais lamelopódios (**Figura 27C, asterisco**) e filopódios (**Figura 27H, seta**) foram comumente observados interagindo com o substrato.

Figura 27 – Avaliação morfológica de células HOS cultivadas sobre as diferentes amostras



Fonte: A autora

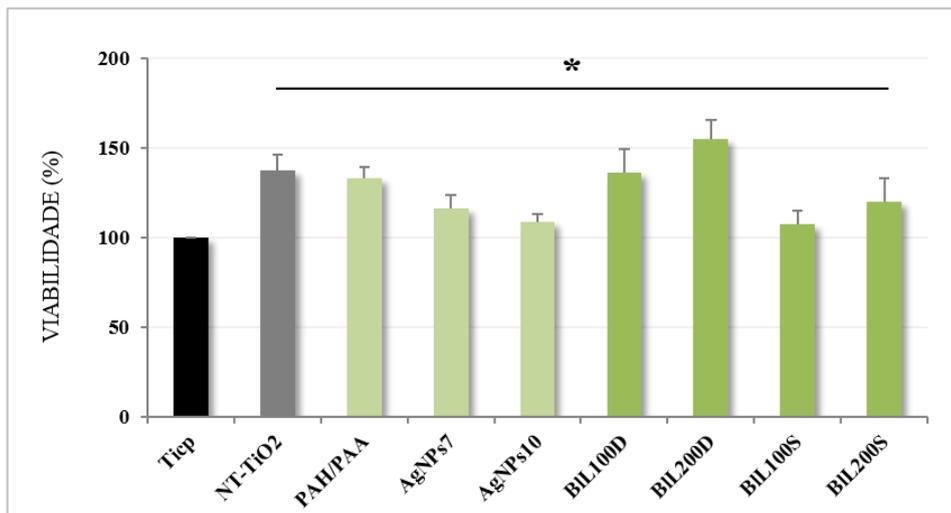
Legenda: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. Células HOS cultivadas por 24h sobre (A) Titânio puro, (B) Nanotubos de TiO₂, (C) Nanotubos de TiO₂ revestidos com PAH/PAA, (D) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 7mM, (E) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 10mM, (F) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 100µg/mL por *dip coating*, (G) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 200µg/mL por *dip coating*, (H) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 100µg/mL por *spin coating*, (I) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 200µg/mL por *spin coating*. O asterisco e a seta destacam lamelopódios e filopódios em célula HOS, respectivamente.

5.4.3 Avaliação da viabilidade celular

A fim de mensurar a proliferação das células cultivadas sobre as amostras, após 72 horas de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, comparando os diferentes grupos de NTs-TiO₂ com o grupo Ticp.

Nossos resultados mostram que todos os grupos de NTs-TiO₂, exibiram um aumento na viabilidade celular, evidenciando a baixa citocompatibilidade do Ticp às demais amostras que foram obtidas por anodização e anelamento, bem como suas modificações. Os grupos NTs-TiO₂, PAH/PAA e BIL200DC, foram os que apresentaram uma melhor performance, em consonância com os resultados de adesão e ultraestrutura. Apesar dos grupos AgNPs7, AgNPs10, BIL100SC e BIL200SC apresentarem um aumento significativo da viabilidade em relação ao Ticp, a média da porcentagem de viabilidade para estes grupos foi inferior aos demais grupos de NTs-TiO₂ modificados. O grupo que apresentou uma porcentagem de viabilidade maior em relação ao Ticp foi o grupo BIL200D (**Gráfico 3**).

Gráfico 3 – Viabilidade das células HOS cultivadas sobre as diferentes amostras



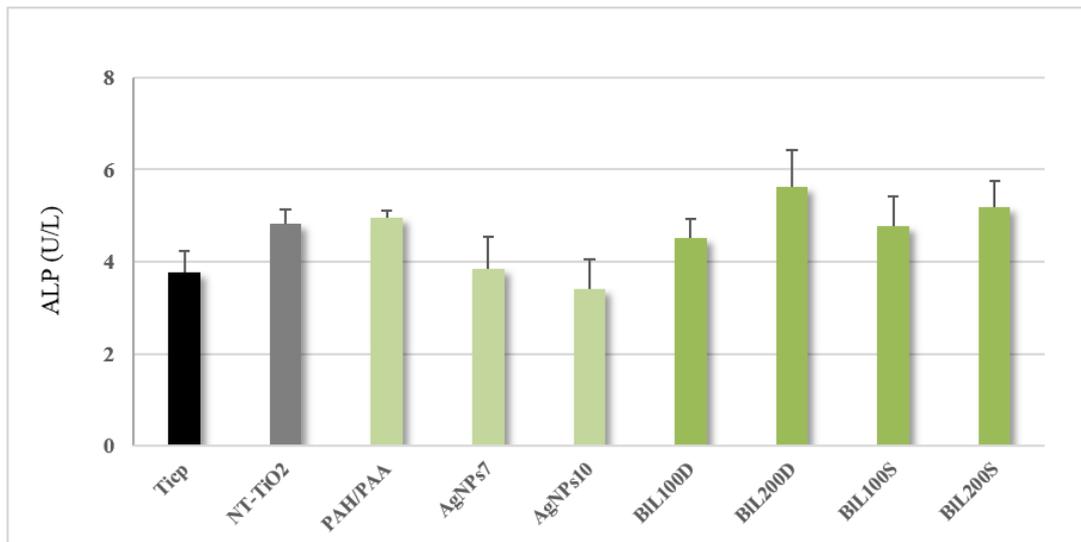
Fonte: A autora

Legenda: Viabilidade das células HOS cultivadas 72 horas sobre (Ticp) Titânio puro, (NT-TiO₂) Nanotubos de TiO₂, (PAH/PAA) Nanotubos de TiO₂ revestidos com PAH/PAA, (AgNPs7) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 7mM, (AgNPs10) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 10mM, (BIL100D) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 100µg/mL por *dip coating*, (BIL200D) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 200µg/mL por *dip coating*, (BIL100S) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 100µg/mL por *spin coating*, (BIL200S) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 200µg/mL por *spin coating*. (*) os valores foram significativos quando comparados com Ticp onde $p < 0,05$.

5.4.4 Avaliação do potencial osteogênico

No gráfico 4 estão apresentados os resultados de atividade de fosfatase alcalina para todos os biomateriais avaliados, após 72 horas de incubação. Esta enzima é produzida pelas células osteoblásticas durante a formação da matriz óssea, sendo usada como um dos marcadores para avaliação do processo de osteogênese. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas na produção de fosfatase alcalina ($p > 0.05$) quando comparados todos os grupos com Ticp e com NTs-TiO₂ sem modificação, houve um incremento da produção desta enzima em todos os grupos, exceto o grupo AgNPs. O grupo BIL200D foi o que apresentou uma maior produção de fosfatase alcalina em relação aos demais grupos. Para este grupo a produção de ALP foi de $5,2 \pm 0,58$ U/L, enquanto para Ticp e NTs-TiO₂ os resultados foram $3,8 \pm 0,45$ e $4,8 \pm 0,33$ U/L, respectivamente.

Gráfico 4 – Atividade da fosfatase alcalina em células HOS cultivadas sobre as diferentes amostras



Fonte: A autora

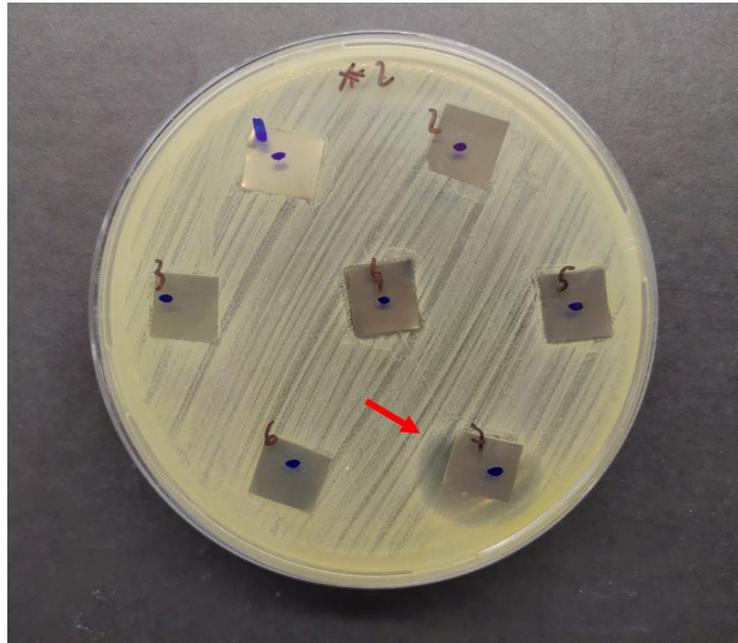
Legenda: Atividade da fosfatase alcalina em células HOS cultivadas 72 horas sobre (Ticp) Titânio puro, (NT-TiO₂) Nanotubos de TiO₂, (PAH/PAA) Nanotubos de TiO₂ revestidos com PAH/PAA, (AgNPs7) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 7mM, (AgNPs10) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 10mM, (BIL100D) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 100µg/mL por *dip coating*, (BIL200D) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 200µg/mL por *dip coating*, (BIL100S) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 100µg/mL por *spin coating*, (BIL200S) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 200µg/mL por *spin coating*. Os resultados expressos em U/L, correspondem à quantidade de enzima que liberam por hidrólise 1µM de timolftaleína por minuto, por litro de solução. Os valores encontrados não apresentaram diferença significativa.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que o revestimento dos NT-TiO₂ com a lectina BIL pela metodologia *dip coating* é capaz de melhorar significativamente a biocompatibilidade deste material.

5.5 Atividade Bactericida

A capacidade das diferentes amostras em prevenir a colonização por bactérias foi verificada através do teste de inibição conforme figura 28. A amostra BIL200 foi a única capaz de evitar o crescimento de *S. aureus*, com um halo de inibição de 5mm.

Figura 28 – Inibição do crescimento bacteriano frente as diferentes amostras



Fonte: A autora

Legenda: Inibição do crescimento de *S. aureus* frente a (1) Titânio cp, (2) Nanotubos de TiO₂, (3) Nanotubos de TiO₂ revestidos com PAH/PAA, (4) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 7mM, (5) Nanotubos de TiO₂ impregnados com Ag 10mM, (6) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 100µg/mL por *dip coating*, (7) Nanotubos de TiO₂ impregnados com BIL a 200µg/mL por *dip coating*. A seta em vermelho destaca o único halo de inibição formado após 24 horas de incubação.

6 DISCUSSÃO

O titânio tornou-se o principal material de escolha para implantes devido as excelentes propriedades mecânicas, como alta resistência à corrosão, baixo módulo de elasticidade, além de estar disponível em quantidade abundante nos depósitos minerais naturais (VALIEV et al., 2020). A oxidação anódica do Ticp costumava ser um tipo de tecnologia para aumentar a resistência à corrosão de implantes do tipo parafuso. No entanto, devido ao desenvolvimento dos controles de voltagem, concentração e temperatura, hoje esta modificação é normalmente utilizada para aumentar a espessura da camada de TiO_2 e fabricar nanoestruturas controláveis nas superfícies dos implantes de titânio (LIU et al., 2019). Os NTs- TiO_2 obtidos neste estudo exibiram um diâmetro em torno de 73 nm. Embora não exista um consenso sobre um diâmetro ideal, estudos têm demonstrado que diâmetros entre 50 e 100 nm são capazes de favorecer a adesão e proliferação celular, além de exibirem um maior espaçamento entre os nanotubos, o que é particularmente importante para acomodar proteínas de menor tamanho, que uma vez ancoradas, podem tanto favorecer à biocompatibilidade como atuar na entrega controlada de fármacos ou de moléculas de interesse (KULKARNI et al., 2015, DOS ANJOS et al., 2021). Sabe-se que TiO_2 pode existir em 8 diferentes formas cristalográficas. Neste estudo, utilizamos o método de anodização seguido do tratamento com altas temperaturas, para modificar a forma cristalográfica amorfa dos NT- TiO_2 para a forma anatase a qual se assemelha à estrutura cristalina do osso, favorecendo a osseointegração (BAI et al., 2011). De fato, nossos resultados mostram todas as superfícies obtidas por essa técnica apresentaram uma maior adesão das células em comparação ao Ticp.

A deposição dos polímeros de hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH) ácido poli(acrílico) (PAA) através do método de *layer by layer (LbL)* tem sido reconhecida como uma importante técnica para preparação de filmes com multicamadas, com simplicidade e versatilidade. Esta técnica também é utilizada para modificar a superfície de nanotubos favorecendo as interações com biomoléculas (LIANG et al., 2003; OLIVEIRA et al, 2018). Os filmes construídos através deste método, resultam em um substrato altamente adesivo, uniforme e estável que também podem ter suas propriedades modificadas a depender de parâmetros como concentração, pH e número de camadas produzidas (PATTABHI et al., 2014). Assim, visando sempre melhorar a citocompatibilidade dos NTs- TiO_2 , nós utilizamos o *LbL* como etapa prévia a impregnação com prata e a adsorção da BIL. Sabe-se que as propriedades dos filmes como a espessura e morfologia das camadas são dramaticamente influenciadas por fatores tais como: tempo de

imersão, temperatura, concentração do polieletrólito, força iônica e pH das soluções de trabalho, entre outros. Desta forma, as condições utilizadas para construção do filme sobre os NTs -TiO₂ devem ser otimizadas para uma melhor padronização dos resultados. Por exemplo, a formação de um filme muito grosso pode interferir na topografia e nanoestrutura do NTs-TiO₂, dificultando a interação com osteoblastos. Desta forma, para otimizar a construção dos filmes, nós testamos a influência de diferentes pHs e número do camadas formadas na incorporação da prata e da lectina, bem com sobre a adesão celular. Nossos resultados mostraram que, apesar de todas as condições experimentais (Modos 1-4, Tabela 1) testadas terem sido capazes de favorecer a formação e deposição das AgNPs, a quantidade e distribuição destas partículas sobre os filmes foram diferentes entre os modos. Os modos 2 e 4, ambos de 8 camadas, tendo o PAA como último layer, mas com diferentes pHs, foram os que visualmente mostraram uma melhor distribuição e maior quantidade de prata adsorvida na superfície dos nanotubos. Isto ocorre porque com a finalização do sistema *LbL* em PAA foi possível formar grupos COO- disponíveis para interagir com os grupos Ag⁺ do acetato de prata por meio de interações eletrostáticas, favorecendo assim melhores condições para adsorção da prata. 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). Este perfil de prata iônica foi identificado por DRX unicamente na amostra do Modo 2, tornando este grupo de interesse para os ensaios microbiológicos.

Estudos prévios mostraram que quando eram utilizados os dois polímeros em baixo pH, os filmes construídos se mostravam altamente tóxicos para células HOS (ANJOS, 2015) e para componentes sanguíneos (CHIEN, 2010). No teste de adesão realizado nas amostras dos Modos 1-4, pudemos observar que somente as amostras do Modo 1 e Modo 2, foram capazes de promover uma boa citocompatibilidade. Esta mudança de perfil conforme variação do pH ocorre devido à conformação adquirida pela bicamada PAH/PAA. Estudos mostraram que a depender do grau de ionização de grupos carboxilato (-COO-) de um PAA e os grupos amina (-NH₃-) de um PAH, uma quantidade maior de um dos polímeros é adsorvida para compensar o outro, formando uma composição não estequiométrica (CHOI; RUBNER, 2004; CRANFORD et al., 2010). Os grupamentos químicos excedentes se tornam completamente ionizados em pH fisiológico favorecendo a hidratação que acaba gerando inchaço e baixa rigidez do filme (CHIEN, 2010). Shiratori & Rubner (2000) demonstraram em seu estudo, a variação da espessura da bicamada PAH/PAA com base na mudança do pH destes polieletrólitos. De fato, as combinações PAH pH 4,5 + PAA pH 7,5 formam filmes ultrafinos,

enquanto PAH pH 7,5 + PAA pH 4,5 formam bicamadas $>80 \text{ \AA}$. Estes dados explicam a baixa adesão de células HOS nas amostras dos Modos 3 e 4, já que um filme espesso não fornece a rigidez e estabilidade química necessárias para o crescimento celular, além de impossibilitar o contato direto das células com os NTs-TiO₂. Esses dados também puderam ser observados nas análises por MEV, nas quais apesar de não haver alteração na morfologia nanotubular, as imagens obtidas nos Modos 3 e 4 têm um aspecto mais denso e com perda da nitidez, quando comparados aos Modos 1 e 2. Pelos bons resultados na adesão celular e no perfil de AgNPs, o Modo 2 foi o protocolo padrão de *Layer by layer* utilizado para sintetizar as demais amostras.

Os filmes ultrafinos automontados foram utilizados para a impregnação de Ag, em duas concentrações: 7 e 10mM, assim como para a lectina BIL também em duas concentrações: 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Na análise por MEV, os resultados observados nos testes de padronização foram reproduzidos sendo possível observar a formação dos NT-TiO₂ sem nenhuma alteração visual de sua topografia.

Para as amostras revestidas com prata, a formação de AgNPs foi realizada por uma exposição à luz UV por 12 horas, após a incubação com as diferentes concentrações de acetato de prata. 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 nanopátulas formadas sobre o filme. As imagens obtidas por MEV sugerem uma maior quantidade de AgNPs na concentração de 7mM, no entanto seria necessária uma quantificação da Ag por ICP-MS, para comparar o rendimento da impregnação das duas concentrações.

Enquanto as análises de DRX, realizada na fase de padronização foram capazes de identificar o grau de ionização da prata (Ag^0 e Ag^+), o EDS foi utilizado para averiguarmos a incorporação da Ag através da composição química das amostras. Em acréscimo, o FTIR indicou a ligação química da Ag ao PAH/PAA devido à ausência dos picos 1324 cm^{-1} , 1404 cm^{-1} e 1554 cm^{-1} nestes grupos. Apesar de serem três metodologias de caracterização de amostras, o objetivo ao usar cada uma delas é diferente. O EDS detecta quais são elementos químicos presentes na superfície da amostra, enquanto o DRX traz informações referentes ao arranjo químico desses elementos e o FTIR, por sua vez, é capaz de capturar as ligações e grupamentos químicos (ORÉFICE et al, 2012). Em conjunto, os resultados obtidos demonstram o sucesso na modificação do titânio comercialmente puro, e comprovam a incorporação dos polímeros e AgNPs e da lectina sobre a superfície dos NT-TiO₂.

Para as amostras revestidas com a lectina BIL, não foram observadas alterações visuais entre as metodologias *dip coating* e *spin coating* quando observadas ao MEV, sugerindo que o *spin coating*, também foi capaz de formar filmes ultrafinos. A principal evidência da presença da

lectina na superfície dos substratos foi obtida através do FTIR pelas duas bandas principais das proteínas, a banda da amida I ($1720-1600\text{ cm}^{-1}$) referindo-se principalmente à ligação peptídica C = A vibração de alongamento e a banda da amida II ($1600-1500\text{ cm}^{-1}$) resultante das ligações NH e CN (MYSHAKINA et al., 2009; GRUIAN et al., 2012; KOURKOUMELIS et al., 2012). As amostras produzidas por *spin coating* exibiram estas bandas de maneira muito mais clara, e no mesmo perfil da BIL livre e pura, já que não possuem PAH/ PAA em sua composição. As bandas encontradas estão de acordo com o perfil observado em estudos que sugeriram a impregnação de outras lectinas na superfície dos NT-TiO₂ (DOS ANJOS, 2015; OLIVEIRA et al., 2018; DOS ANJOS et al., 2021).

Do ponto de vista biológico, nossos resultados comprovam os benefícios da obtenção de nanotubos de TiO₂ pelo processo de anodização, através do qual observamos uma melhora significativa nos parâmetros adesão e viabilidade de células HOS em comparação à superfície do Ticp. Nos últimos anos, têm surgido evidências cada vez mais claras que o processo de osseointegração é facilitado pela interação entre uma superfície rugosa dos biomateriais e o tecido ósseo em reparação. Por isso, diversos sistemas de implantes utilizam de metodologias variadas para que uma superfície, constituída por sulcos ou poros, seja criada (ALBREKTSSON et al., 2019). Implantes com superfícies nanoestruturadas não só aumentam a área de contato, mas também possibilitam o crescimento de células do tecido ósseo para o interior dos poros, produzindo uma rede tridimensional. Nossas análises ultraestruturais comprovam a íntima relação das células ao substrato através da emissão de lamelopódios e filopódios, além de um maior espalhamento na interface NT-TiO₂-HOS. Em outras palavras, apenas o processo de anodização é capaz de favorecer a adesão celular. A biocompatibilidade deste material pôde ser melhorada nos NT-TiO₂ revestidos com PAH/PAA, com aumento significativo da adesão e morfologia celular condizentes com o perfil citofílico destes polímeros (MOUSSALLEM et al., 2009; PATTABHI et al., 2014). Por outro lado, Apesar de apresentar uma melhoria significativa em relação aos Ticp, as amostras com AgNPs revestidas com PAH/PAA reduziram significativamente as células aderidas e sinais de citotoxicidade, como arredondamento celular, perda dos contatos focais, e inibição da proliferação foram observados, sugerindo que nas condições de cultivo a prata foi tóxica para as células HOS.

Ao contrário do observado na prata, a incorporação da lectina BIL à superfície revestida por PAH/ PAA levou a um aumento da adesão e viabilidade celular comparada ao do tratamento do PAH/PAA, sobretudo na maior concentração testada – 200 µg/mL. Interessantemente, uma maior organização das células foi observada nas superfícies tratadas nesta concentração. Isso corrobora o papel das lectinas no remodelamento do tecido ósseo (DOS ANJOS et al., 2021).

Assim, a lectina adsorvida cria um biomimetismo do que acontece in vivo na interface da superfície porosa de NT-TiO₂, uma vez que quando um implante é inserido no corpo humano, ele é naturalmente revestido por uma camada de proteínas do soro (LUO et al., 2020).

As lectinas são proteínas de origem não imunológica que se ligam especificamente à resíduos de açúcares, participando de diferentes processos fisiológicos e patológicos, sendo o papel destas proteínas na formação e reparo do tecido ósseo já reconhecido na literatura. A lectina SigLec-15 por exemplo, uma proteína transmembrana expressa nas células precursoras que darão origem aos osteoclastos, tem papel fundamental na diferenciação destas células e no desenvolvimento da osteoporose. Estudos realizados por Tsukazaki et al., (2021) demonstraram que anticorpos contra esta lectina são capazes de inibir a maturação dos osteoclastos, mantendo a formação do osso de forma semelhante à da droga risedronato sódico, usada no tratamento da osteoporose. Em um estudo prévio, Oliveira et al. (2018) demonstraram que a lectina Cramoll, isolada da planta *Cratylia mollis*, foi eficiente adsorvida na superfície de NTs-TiO₂ obtidos por anodização e modificados por *LbL*. Esta lectina foi capaz de melhorar substancialmente os parâmetros de adesão, proliferação e osteogênese, no mesmo modelo celular utilizado no nosso estudo. Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que a deposição de uma lectina do soro do peixe *Oreochromis niloticus* (OniL), que se liga a manose, sobre a superfície de NTs-TiO₂ também produziu resultados semelhantes (DOS ANJOS et al., 2021). No entanto, neste estudo esta proteína foi depositada diretamente sobre os nanotubos através de *spin coating*. Nossos resultados mostram que a deposição da lectina BIL tanto por *spin coating* (diretamente sobre os nanotubos) ou por *dip coating* favoreceram a adesão celular e viabilidade comparada com Ticp e o NTs-TiO₂ sem nenhum tratamento de superfície. No entanto, a citocompatibilidade da lectina BIL adsorvida por *dip coating* (BIL200D), foi melhor do que nas amostras obtidas por *spin coating* na mesma concentração da lectina. Estes achados sugerem que a lectina BIL age em sinergismo com as bicamadas de PAH/PAA potencializando os efeitos deste tipo de funcionalização. Como as duas técnicas foram eficazes em favorecer uma maior citocompatibilidade, a principal vantagem do *spin coating* seria o seu baixo custo em função da sua simplicidade, da menor quantidade de reagentes empregados e da redução do tempo de preparo das amostras.

As fosfatases alcalina não específicas (ALP) desempenham papel vital na mineralização do tecido ósseo e na osteogênese. As ALPs são metaloproteínas diméricas com peso entre 70 à 180 kDa, contendo Zn²⁺ e Mg²⁺, expressas principalmente em osteoblastos diferenciados. Como uma importante enzima hidrolítica, a ALP catalisa a remoção de grupos fosfatos de ácidos nucleicos, proteínas e pequenas moléculas sob condição alcalina, e desta forma, tornam-se

marcadoras dos eventos de osteogênese uma vez que aumentam a disponibilidade local de fosfato inorgânico para a nucleação dos cristais de hidroxiapatita (AZARI et al., 2008; WANG et al., 2021, LIU et al., 2005). Nossos resultados mostraram que todos os substratos favoreceram a produção desta enzima, e, portanto, a osteogênese, com uma maior produção nas amostras BIL200DC. Apesar de não terem sido significativas, a tendência ao aumento de ALP nas amostras *in vitro*, observadas neste estudo, aponta para um efeito positivo dos diferentes tratamentos da superfície do NTs-TiO₂, sobretudo os tratados com a lectina, no processo de osteogênese. Vários fatores como o tempo e o tipo de substrato tem mostrado influenciar a adesão e osteogênese de células sobre as superfícies. Um estudo realizado por Ikeda et al. (1992), por exemplo, mostrou que células HOS cultivadas em superfícies de plástico alcançam a osteogênese apenas após 3 semanas de cultivo. Por outro lado, o recobrimento de NTs-TiO₂ com peptídeos derivados de laminina, importante proteína de adesão encontrada na MEC, é capaz de reduzir o tempo necessário para osteogênese para 24 horas (MIN et al., 2013; WANG et al., 2000). Desta forma, pode ser o tempo de 72 horas padronizado para os nossos experimentos, não tenha sido suficiente para identificarmos uma diferença significativa, embora um aumento na atividade da ALP, sobretudo nas tratadas com lectina, pudesse ter sido observada.

Um dos principais problemas da falha dos implantes e próteses baseados em NT-TiO₂ é a rápida colonização de sua superfície por bactérias com posterior formação de um biofilme por estes microrganismos (CHOUIRFA et al., 2019). Infecções relacionadas ao implante podem resultar em complicações graves, bem como levar a um mau prognóstico, sofrimento do paciente e até morte. Nanopartículas de prata (AgNPs) tem sido consideradas um agente promissor na modificação da superfície para prevenir infecções (QING et al., 2018). Desta forma, objetivando conferir aos NTs-TiO₂ propriedades bactericidas, nanopartículas de prata foram incorporadas à sua superfície e confrontadas com cepas de *S. aureus* por ser o microorganismo mais comum neste tipo de infecção associada aos implantes (LIU et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). Nossos resultados mostraram que nenhuma das amostras recobertas com AgNPs foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*. Dosunmu e colaboradores (2015) sugeriram que a atividade bactericida da prata associada a nanotubos de carbono se dá pelo efeito de íons Ag sobre integridade da membrana celular da bactéria, a regulação negativa da expressão de genes associados à virulência, e indução de estresse oxidativo. Os resultados negativos dos nossos experimentos podem ter sido resultantes de uma falha na liberação dos íons Ag⁺ nas condições testadas. 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 podem otimizar a superfície dos nanotubos de TiO₂ gerando uma superfície mais biocompatível com atividade bactericida.

Carboidratos são encontrados nos sistemas vivos sob a forma de oligossacarídeos livres ou como glicoconjugados presentes na superfície celular e na matriz extracelular (MEC). Estas moléculas estão envolvidas em uma gama de funções biológicas incluindo, sinalização, reconhecimento e adesão de moléculas, migração, atividade anti-inflamatória entre outras (SARTIM et al., 2015). Desta forma, o reconhecimento de glicanas específicas por lectina, representa um processo chave em uma variedade de fenômenos, incluindo interações célula-célula e célula-MEC, os quais são processos chaves envolvidos na osseointegração. Nossos resultados demonstraram que a presença da lectina BIL pode favorecer estas interações aumentando as chances de sucesso dos implantes. Por favorecer a rápida adesão dos osteoblastos, essa proteína pode impedir que bactérias presentes na cavidade oral possam colonizar a superfície dos NTs-TiO₂ causando infecções. Adicionalmente, foi demonstrado que amostras recobertas com BIL200D foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* em nosso estudo. Esses dados corroboram com os achados de Nunes e colaboradores (2011) que demonstraram que a lectina BIL está envolvida na atividade bactericida do veneno total de *Bothrops leucurus* frente a bactérias gram-positivas patogênicas (TORRES et al., 2010).

O conjunto de resultados observados nas amostras do grupo BIL sugerem uma melhoria na biocompatibilidade *in vitro* destes materiais, além de inibir o crescimento bacteriano. 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 do nosso estudo em aliar lectinas a implantes contribuindo de forma significativa na melhoria da qualidade dos biomateriais.

7 CONCLUSÕES

- a) Os NT-TiO₂ obtidos neste estudo, na fase anatase e com diâmetro em torno de 70 nm, apresentaram uma excelente biocompatibilidade favorecendo tanto a adesão quanto a proliferação celular corroborando com as melhorias observadas no uso do titânio em sua forma nanoestruturada.
- b) A deposição de filmes de PAH/ PAA em pH 7,5/ 4,5 na superfície dos NT-TiO₂ foi capaz de aumentar significativamente a adesão e proliferação das células, além de ser eficaz na imobilização das AgNPs e da lectina BIL.
- c) *Dip* e *spin coating* se mostraram metodologias eficazes no recobrimento de NT-TiO₂ com lectinas, formando filmes ultrafinos adsorvidos tanto nas bicamadas de PAH/PAA como diretamente na superfície dos NT-TiO₂.
- d) As amostras de NT-TiO₂ revestidas com PAH/ PAA e AgNPs não foram capazes de inibir o crescimento *S. aureus*, nem de aumentar a citocompatibilidade quando comparadas aos NT-TiO₂ sem modificação, sugerindo uma toxicidade associada a este tipo de preparação.
- e) As amostras de NT-TiO₂ revestidas com PAH/ PAA e a lectina BIL favoreceram uma melhor adesão e proliferação celular, além de conferir propriedades bactericidas à superfície quando comparadas aos NT-TiO₂ sem modificação.
- f) Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo apontam para o potencial biotecnológico da lectina BIL como alternativa para a funcionalização de biomateriais.

REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T. *et al.* Osseointegration of implants – a biological and clinical overview. **JSM Dental Surgery**, v. 2, n. 3, p. 1–6, 2017.
- ALBREKTSSON, T. *et al.* On osseointegration in relation to implant surfaces. **Clinical Implant Dentistry And Related Research**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 4-7, 2019.
- ANJOS, K.F.L *et al.* The Deposition of a Lectin from *Oreochromis Niloticus* on the Surface of Titanium Dioxide Nanotubes Improved the Cell Adhesion, Proliferation, and Osteogenic Activity of Osteoblast-like Cells. **Biomolecules** 2021. No prelo.
- 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.
- ARANDA-SOUZA, M. A. *et al.* A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon**, [s. l.], v. 82, p. 97-103, 2014.
- ARANDA-SOUZA, M. A. *et al.* In vitro effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* infection. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 120, p. 431-439, 2018.
- ARCIOLA, C. R. *et al.* Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, [s.l.], v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.
- ARJUNAN, *et al.* Future Directions and Requirements for Tissue Engineering **Biomaterials**, 2021.
- ASHTIANI, R. E. *et al.* The Role of Biomaterials and Biocompatible Materials in Implant-Supported Dental Prosthesis. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2021, p. 1-9, 2021.
- AWAD, N. K. *et al.* A review of TiO₂ NTs on Ti metal: electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 76, p. 1401-1412, 2017.
- AZARI, F. *et al.* Intracellular precipitation of hydroxyapatite mineral and implications for pathologic calcification. **Journal Of Structural Biology**, [S.L.], v. 162, n. 3, p. 468-479, 2008.

BAI, Y. *et al.* The effect of annealing temperatures on surface properties, hydroxyapatite growth and cell behaviors of TiO₂ nanotubes. **Surface and Interface Analysis**, [s.l.], v. 43, n. 6, p. 998-1005, 2011.

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.

BAKIR, M. *et al.* Haemocompatibility of titanium and its alloys. **Journal Of Biomaterials Applications**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 3-15, 2012.

BAKRI, A.S. *et al.* Influences of deposition layer on the properties of titanium dioxide thin films fabricated by dip coating technique, **ARPJ. Eng. Appl. Sci.** v.11 p. 8834–8839, 2016.

BAPAT, R. A. *et al.* An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 91, p. 881-898, 2018.

BOLELLI, G. *et al.* Suspension thermal spraying of hydroxyapatite: microstructure and in vitro behaviour.: Microstructure and in vitro behaviour. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 34, p. 287-303, 2014.

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.

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

BROGGINI, N. *et al.* Peri-implant Inflammation Defined by the Implant-Abutment Interface. **Journal Of Dental Research**, [s.l.], v. 85, n. 5, p. 473-478, 2006.

BROVOLD, M. *et al.* Naturally-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [S.L.], p. 421-449, 2018.

CALLISTER, W. D. The Structure of Crystalline Solids. *In*: CALLISTER, William D.; RETHWISCH, David G. **Materials Science and Engineering: an introduction**. 8. Ed. 2009. cap. 3, p. 47-51.

CAMPOCCIA, D. *et al.* The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. **Biomaterials**, [s.l.], v. 27, n. 11, p. 2331-2339, 2006.

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. 1-9, 2012.

CATALANI, S *et al.* Vanadium release in whole blood, serum and urine of patients implanted with a titanium alloy hip prosthesis. **Clinical Toxicology**, [s.l.], v. 51, n. 7, p. 550-556, 2013.

CHALOUPKA, K. *et al.* Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 28, n. 11, p. 580-588, 2010.

CHANDRA, A. *et al.* Skeletal Aging and Osteoporosis: mechanisms and therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 3553, 2021.

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.

CHIFFOLEAU E. C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets. **Front Immunol.** 2018.

CHOI, J; RUBNER, M. F. Influence of the Degree of Ionization on Weak Polyelectrolyte Multilayer Assembly. **Macromolecules**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 116-124, 2004.

CHOUIRFA, H. *et al.* Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 83, p. 37-54, 2019.

CHU, P. Plasma-surface modification of biomaterials. **Materials Science And Engineering: R**, [s.l.], v. 36, n. 5-6, p. 143-206, 2002

CLEMETSON, K. J. *et al.* Scientific and standardization committee communications: classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 360-360, 2009.

COELHO, M. F. C. **Recobrimento biomimético em superfícies de Titânio e aço inoxidável austenítico.** 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2013

CRANFORD, S. W. *et al.* Mechanomutable properties of a PAA/PAH polyelectrolyte complex: rate dependence and ionization effects on tunable adhesion strength. **Soft Matter**, [S.L.], v. 6, n. 17, p. 4175, 2010.

CUI, W. *et al.* Self-Assembled Smart Nanocarriers for Targeted Drug Delivery. **Advanced Materials**, [s.l.], v. 28, n. 6, p. 1302-1311, 2015.

DAVIS, J. (ed.). Metallic Materials. *In*: DAVIS, J. (ed.). **Handbook of Materials for Medical Devices.** [s. l]: Asm International, 2003. cap. 3. p. 21-50.

DECHER, G. *et al.* Layer-by-layer assembled multicomposite films. **Current Opinion In Colloid & Interface Science**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 32-39, 1998.

DELCROIX, M.F. *et al.* Protein adsorption can be reversibly switched on and off on mixed PEO/PAA brushes. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 11, p. 68-79, 2015.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 66, n. 17, p. 2851-2871, 2009.

DONACHIE M J. A **Technical Guide: Titanium**, American Technical Publishers, 2000.

DOSUNMU, E. *et al.* Silver-coated carbon nanotubes downregulate the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes: a potential mechanism for their antimicrobial effect. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], p. 5025, 2015.

EBNER, S. *et al.* Evolutionary analysis reveals collective properties and specificity in the C-type lectin and lectin-like domain superfamily. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 53, n. 1, p. 44-55, 2003

FERREIRA, Carlise Hannel. **Desenvolvimento de biomateriais para liberação de fármacos a base de titânio e colágeno**. 2019. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

GIBBS, R.J.; **Silver colloids: Do they work**. [S. l.]: Edição do Autor, 1999.

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.

GOMES, F *et al.* Mini-review: staphylococcus epidermidis the most frequent cause of nosocomial infections: Staphylococcus epidermidis the most frequent cause of nosocomial infections. **Biofouling**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 131-141, 2013.

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

GULATI, K. *et al.* Titania nanotubes for orchestrating osteogenesis at the bone-implant interface. **Nanomedicine**, v. 11, n. 14, p. 1847–1864, 2016.

GUO, S. *et al.* Controlling cell adhesion using layer-by-layer approaches for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, [S.L.], v. 70, p. 1163-1175, 2017.

HA, T. L. B. *et al.* Naturally Derived Biomaterials: preparation and application: Preparation and Application. **Regenerative Medicine And Tissue Engineering**, [s.l.], p. 247-274, 2013.

HAO, Zhichao *et al.* The scaffold microenvironment for stem cell based bone tissue engineering. **Biomaterials Science**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 1382-1392, 2017.

HARADA, R. *et al.* Influence of sulfide concentration on the corrosion behavior of titanium in a simulated oral environment. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 62, p. 268-273, 2016.

HAYASAKI, C. L.; SOUSA, É. A. C. Modelagem de estruturas ósseas e próteses através do método dos elementos finitos. XIII SIMPEP. Anais.2006

HUANG, J. *et al.* Ceramic biomaterials for tissue engineering. *In*: BOCCACCINI, Aldo R. *et al.* **Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers**. 2. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014. cap 1.

IKEDA, T. *et al.* In vitro differentiation of the human osteosarcoma cell lines, HOS and KHOS. **Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology**, [S.L.], v. 62, n. 1, p. 199-206, 1992.

INFANTE, A. *et al.* Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-7, 2018.

JÄGER, Marcus *et al.* Antimicrobial and Osseointegration Properties of Nanostructured Titanium Orthopaedic Implants. **Materials**, [S.L.], v. 10, n. 11, p. 1302, 2017.

KAUL, Prateeksha; JAISWAL, Pallavi. **Bioimplants Market by Type (Cardiovascular Bioimplants, Dental Bioimplants, Orthopedic Bioimplants, Spinal Bioimplants, and Ophthalmology Bioimplants), Material (Metallic Biomaterials, Ceramic Biomaterials, Polymers Biomaterials, and Natural Biomaterials) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2017-2023**. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/bioimplants-market>. Acesso em: 14 abr. 2020.

KEEGAN, G. M *et al.* Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient. **The Journal Of Bone And Joint Surgery. British Volume**, [s.l.], v. 89-, n. 5, p. 567-573, 2007.

KILPATRICK, D. Animal lectins: a historical introduction and overview.: a historical introduction and overview. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 2002.

KIRADZHIYSKA, D. D.; MANTCHEVA, Rositsa D. Overview of Biocompatible Materials and Their Use in Medicine. **Folia Medica**, [s.l.], v. 61, n. 1, p. 34-40, 2019.

KIRMANIDOU, Y *et al.* New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: a review: A Review. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2016, p. 1-21, 2016.

KLIGMAN, S. *et al.* The Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration and Biofilm Formation. **Journal Of Clinical Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1641, 2021.

KOHANE, D., LANGER, R. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. **Pediatr Res** 63, 487–491, 2008

KOHANE, D. S. *et al.* Biocompatibility and drug delivery systems. **Chem. Sci.**, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 441-446, 2010.

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

KUMAR, S. *et al.* Nanotechnology-based biomaterials for orthopaedic applications: recent advances and future prospects. : Recent advances and future prospects. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 106, p. 1-25, jan. 2020.

KUROMOTO, N. K. *et al.* Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. **Materials Characterization**, [s.l.], v. 58, n. 2, p. 114-121, fev. 2007.

KUZYK, P; SCHEMITSCH, E. The basic science of peri-implant bone healing. **Indian Journal Of Orthopaedics**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 108, 2011.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, p. 45–55, 2011.

LEYENS, C; PETERS, M. Titanium and titanium alloys: fundamentals and applications. Ed. Wiley-VHC GmbH&Co. KGaA, 2003.

LI, X *et al.* Biocompatibility and Toxicity of Nanoparticles and Nanotubes. **Journal Of Nanomaterials**, [S.L.], v. 2012, p. 1-19, 2012.

LIANG, Z. *et al.* Nanotubes Prepared by Layer-by-Layer Coating of Porous Membrane Templates. **Advanced Materials**, [S.L.], v. 15, n. 21, p. 1849-1853, 2003.

LIMA, D. C. *et al.* Snake Venom: any clue for antibiotics and cam?: Any Clue for Antibiotics and CAM?. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

LIMA, Tadeu Henrique de. **Modificação do cimento ortopédico com nanopartículas de prata**. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know.: what healthcare professionals should know. **Journal Of Hospital Infection**, [s.l.], v. 64, n. 4, p. 313-325, 2006.

LIU, C. et al. A strontium-modified titanium surface produced by a new method and its biocompatibility in vitro. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0140669, 2015.

LIU, X. et al. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science And Engineering: R**, [s.l.], v. 47, n. 3-4, p. 49-121, 2004.

LUO, H et al. Mechanical properties and biocompatibility of titanium with a high oxygen concentration for dental implants. **Materials Science and Engineering: C**, 2020.

MACAK, J.M et al. TiO₂ nanotubes: self-organized electrochemical formation, properties and applications.: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. **Current Opinion In Solid State And Materials Science**, [s.l.], v. 11, n. 1-2, p. 3-18, fev. 2007.

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. **The Journal Of Physical Chemistry C**, [s.l.], v. 113, n. 44, p. 19005-19010, 13 out. 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.

MADEIRA, M. P et al. Systems developed for application as self-cleaning surfaces and/or antimicrobial properties: a short review on materials and production methods: a short review on materials and production methods. **Cerâmica**, [s.l.], v. 65, n. 375, p. 477-484, set. 2019.

MARAMBIO-JONES, Catalina; HOEK, Eric M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal Of Nanoparticle Research**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 1531-1551, 23 mar. 2010

MARKET PUBLISHERS. **Orthopedic Implants – a Global Market Overview**. 2011.

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.

- MEI, S *et al.* Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. **Biomaterials**, [s.l.], 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. *et al.* Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytother. Res.**, London, v.24, n.11, p.1631-1636, 2010.
- MIN, S *et al.* Titanium Surface Coating with a Laminin-Derived Functional Peptide Promotes Bone Cell Adhesion. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2013, p. 1-8, 2013.
- MISQUITH, S *et al.* 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.
- MORITA, T. C-type Lectin-related Proteins from Snake Venoms. **Current Drug Target - cardiovascular & Hematological Disorders**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 357-373, 1 dez. 2004.
- MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005.
- MOUSSALLEM M. D. *et al.* Smooth muscle cell phenotype modulation and contraction on native and cross-linked polyelectrolyte multilayers. **Biomacromolecules**, 2009.
- NAKASHIMA, K. *et al.* Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. **Trends In Genetics**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 458-466, 2003.
- 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.
- NUNES, Erika S. *et al.* Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, [s.l.], v. 59, n. 7-8, p. 667-671, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.002>.
- 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, W. F. *et al.* Functionalization of titanium dioxide nanotubes with biomolecules for biomedical applications. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 81, p. 597-606, 2017.

OLIVEIRA, W. F. *et al.* Titanium dioxide nanotubes functionalized with Cratylia mollis seed lectin, Cramoll, enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 90, p. 664-672, 2018.

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

PAHARI, S *et al.* Expression pattern of three-finger toxin and phospholipase A2 genes in the venom glands of two sea snakes, *Lapemis curtus* and *Acalyptophis peronii*: comparison of evolution of these toxins in land snakes, sea kraits and sea snakes: comparison of evolution of these toxins in land snakes, sea kraits and sea snakes. **Bmc Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 175, 2007

PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. **Biomaterials: principles and applications**. Boca Raton: Crc Press, 2002.

PATIN, E C. *et al.* Macrophage Inducible C-Type Lectin As a Multifunctional Player in Immunity. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 8, p. 1-10, 2017.

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.

PEULEN, T.; WILKINSON, K. Diffusion of Nanoparticles in a Biofilm. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 45, n. 8, p. 3367-3373, 2011.

PIRES, A. L. R *et al.* Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

SAÚDE BUSINESS. **Mercado de implantes dentários segue em ascensão no Brasil e no mundo**. 2019. Disponível em: <https://saudebusiness.com/mercado/mercado-de-implantes-dentarios-segue-em-ascensao-no-brasil-e-no-mundo/>. Acesso em: 16 abr. 2020.

PRASAD, K. *et al.* Metallic Biomaterials: current challenges and opportunities. **Materials**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 884, 31 jul. 2017.

PRASAD, S. *et al.* Biomaterial properties of titanium in dentistry. **Journal Of Oral Biosciences**, [s.l.], v. 57, n. 4, p. 192-199, nov. 2015.

QING Y, *et al.* Potential antibacterial mecanismo of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. **Int J Nanomedicine**. 2018.

RABIN, Nira *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 493-512, mar. 2015. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.15.6>.

RODRIGUES, S. *et al.* Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. **Journal Of Functional Biomaterials**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 615-641, 2012.

ROGUSKA, A. *et al.* Characterization of a calcium phosphate–TiO₂ nanotube composite layer for biomedical applications. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 31, n. 5, p. 906-914, 2011.

ROJAEI, R. *et al.* Electrophoretic deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on AZ91 magnesium alloy implants with different surface treatments. **Applied Surface Science**, [s.l.], v. 285, p. 664-673, 2013.

SETIAWATI, R.; RAHARDJO P. Bone Development and Growth, **Osteogenesis and Bone Regeneration**, Haisheng Yang, IntechOpen, 2018.

ROY, P. *et al.* TiO₂ Nanotubes: synthesis and applications.:Synthesis and Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 50, n. 13, p. 2904-2939, 2011.

SAINI, M. *et al.* Implant biomaterials: a comprehensive review. **World Journal of Clinical Cases**, v. 3, n. 1, p. 52–57, 2015.

SALHOTRA, A *et al.* Mechanisms of bone development and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 696-711, 2020.

SARTIM, M. A. *et al.* Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. **Journal of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-11, 2015.

SCHOLZ, M.S. *et al.* The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: a review. **Composites Science And Technology**, [S.L.], v. 71, n. 16, p. 1791-1803, 2011.

SHAH, F. A. *et al.* Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants — Is one truly better than the other? **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 62, p. 960-966, 2016.

SHARON, N. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [s.l.], v. 14, n. 11, p. 53-62, 2004

SHI, Q. *et al.* Surface Modification of Dental Titanium Implant by Layer-by-Layer Electrostatic Self-Assembly. **Frontiers in Physiology**, [s.l.], v. 8, p. 1-7, 2017.

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.

SHUKLA, A.; ALMEIDA, B. Advances in cellular and tissue engineering using layer-by-layer assembly. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 411-421, 2014.

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.

SIMA, F. *et al.* Inorganic–Organic Thin Implant Coatings Deposited by Lasers. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 911-920, 19 dez. 2014. American Chemical Society (ACS).

SMITH, P. *et al.* Injectable biomaterials for cell, gene and protein therapy. **Materials Technology**, [s.l.], v. 30, n. 8, p. 264-272, 2015.

TANG G, *et al.* Recent Trends in the Development of Bone Regenerative Biomaterials. **Front Cell Dev Biol.** v.9, 2021.

TORRES, A. F. C. *et al.* Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops leucurus snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. Botucatu: Cevap-unesp, v. 16, n. 4, p. 614-622, 2010.

TROMBINO, S. *et al.* Polymeric Biomaterials for the Treatment of Cardiac Post-Infarction Injuries. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 1038, 2021.

TSUKAZAKI, H *et al.* Anti-Siglec-15 antibody suppresses bone resorption by inhibiting osteoclast multinucleation without attenuating bone formation. **Bone**, [S.L.], v. 152, p. 116095, 2021.

VALIEV, R Z. *et al.* Developing Nanostructured Ti Alloys for Innovative Implantable Medical Devices. **Materials**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 967, 2020.

VALLET-REGÍ, M. Ceramics for medical applications. **Journal of the Chemical Society**, v. 2, n. 2, p. 97–108, 2001.

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

VILLIERS, M. M. *et al.* Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 63, n. 9, p. 701-715, 2011.

VROMAN L. The importance of surfaces in contact phase reactions. **Semin Thromb Hemost.** ;13(1):79-85, 1987.

LATTANZI, W.; BERNARDINI, C. Genes and Molecular Pathways of the Osteogenic Process, **Osteogenesis**, Prof. Yunfeng Lin (Ed.), 2012

WANG, H. *et al.* Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 365-372, 2000.

WANG, R. *et al.* Inhibition of escherichia coli and proteus mirabilis adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 109, n. 2, p. 336-345, 2011.

WANG, W. *et al.* Electrochemical detection of alkaline phosphatase activity through enzyme-catalyzed reaction using aminoferrocene as an electroactive probe. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 413, n. 7, p. 1827-1836, 2021.

WILLIAMS, D. F. *et al.* Assessing the triad of biocompatibility, medical device functionality and biological safety. **Medical Devices & Sensors**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-16, 2020.

XIANG, Y. *et al.* Layer-by-layer self-assembly in the development of electrochemical energy conversion and storage devices from fuel cells to supercapacitors. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 41, n. 21, p. 7291-7322, 2012.

YANG, K. *et al.* Bio-Functional Design, Application and Trends in Metallic Biomaterials. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 1-21, 2017.
YU, G. *et al.* Solution-Processed Graphene/MnO₂Nanostructured Textiles for High-Performance Electrochemical Capacitors. **Nano Letters**, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 2905-2911, 2011.

ZARPELON, Fabiana. **Preparação, Caracterização e Aplicação de Filmes Finos de PAH/PAA com Nanopartículas de Prata no Tratamento Microbiológico de Efluentes Industriais para Reuso**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013.

ZHU, L. *et al.* Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. **International Journal Of Oral Science**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-15, 2020.

ZINGER, O. *et al.* Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. **Biomaterials**, [s.l.], v. 25, n. 14, p. 2695-2711, 2004.

ANEXO A: ARTIGO COMO AUTOR PRINCIPAL ACEITO PARA PUBLICAÇÃO
NA *BIOMOLECULES*



biomolecules

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

Certificate of acceptance for the manuscript (biomolecules-1361159) titled:

The deposition of a lectin from *Oreochromis niloticus* on the surface of titanium dioxide nanotubes improved the cell adhesion, proliferation, and osteogenic activity of osteoblast-like cells

Authored by:

Keicyanne Fernanda Lessa dos Anjos; Cynarha Daysy Cardoso da Silva; Mary Angela Aranda de Souza; Janaina Viana de Melo; Alessandra Batista de Mattos; Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho;

Giovanna Machado; Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo



has been accepted in *Biomolecules* (ISSN 2218-273X) on 16 September 2021

Base, October 2021

ANEXO B: ARTIGO COMO COAUTOR PUBLICADO NA *JOURNAL OF DRUG DELIVERY AND TECHNOLOGY*

Journal of Drug Delivery Science and Technology 60 (2020) 101876



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst



Research paper

Synthesis, characterization and cytotoxicity of the *Eugenia brejoensis* essential oil inclusion complex with β -cyclodextrin



Nataly Amorim de Santana^{a,b,c,*}, Rayane Cristine Santos da Silva^{a,c}, Sophie Fourmentin^d, Keicyanne Fernanda Lessa dos Anjos^c, Márcio Akio Ootan^c, Alexandre Gomes da Silva^e, Bianca Galúcio Pereira Araújo^c, Maria Tereza dos Santos Correia^{a,e}, Márcia Vanusa da Silva^{a,e}, Giovanna Machado^c

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n^o - Cidade Universitária, Recife, CEP: 50670-420, Brazil

^b Centro Regional de Ciências Nucleares – CRCN/NE, Av. Prof. Luiz freire, 01. Cidade Universitária, Recife, CEP: 50.740-540, Brazil

^c Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, Av. Prof. Luiz freire, 01. Cidade Universitária, Recife, CEP: 50.740-540, Brazil

^d Unite de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA 4492), SFR Condorcet FR CNRS 3417, ULCO, F-59140, Dunkerque, France

^e Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n^o - Cidade Universitária, Recife, CEP: 50670-420, Brazil

* Corresponding author. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n^o - Cidade Universitária, Recife, CEP: 50670-420, Brazil.

E-mail addresses: nataly.santana@cnen.gov.br, nataly.amorim@gmail.com (N.A. de Santana).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101876>

Received 13 January 2020; Received in revised form 28 May 2020; Accepted 15 June 2020

Available online 9 July 2020

1773-2247/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.