

**MINISTÉRIO DA DEFESA  
EXÉRCITO BRASILEIRO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS**

**ANDRÉ AGUIAR MARQUES**

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE APATITA SEMELHANTE AO OSSO EM  
SUPERFÍCIES DE TITÂNIO FUNCIONALIZADAS COM PEPTÍDEO pVTK DE  
LIGAÇÃO À HIDROXIAPATITA**

**RIO DE JANEIRO  
2024**

ANDRÉ AGUIAR MARQUES

ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE APATITA SEMELHANTE AO OSSO EM  
SUPERFÍCIES DE TITÂNIO FUNCIONALIZADAS COM PEPTÍDEO pVTK  
DE LIGAÇÃO À HIDROXIAPATITA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador(es): Carlos Nelson Elias, D.C.  
Marcelo Henrique Prado da Silva, D.C.  
Álvaro José Boareto Mendes, D.C.

Rio de Janeiro

2024

©2024

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmар ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

Marques, André Aguiar.

ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE APATITA SEMELHANTE AO OSSO EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO FUNCIONALIZADAS COM PEPTÍDEO pVTK DE LIGAÇÃO À HIDROXIAPATITA / André Aguiar Marques. – Rio de Janeiro, 2024.

104 f.

Orientador(es): Carlos Nelson Elias, Marcelo Henrique Prado da Silva e Álvaro José Boareto Mendes.

Tese (doutorado) – Instituto Militar de Engenharia, Ciência e Engenharia de Materiais, 2024.

1. biomateriais. 2. funcionalização. 3. peptídeo. 4. bioatividade. 5. titânio. i. Nelson Elias, Carlos (orient.) ii. Prado da Silva, Marcelo Henrique (orient.) iii. Boareto Mendes, Álvaro José (orient.) iv. Título

**ANDRÉ AGUIAR MARQUES**

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE APATITA SEMELHANTE  
AO OSSO EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO  
FUNCIONALIZADAS COM PEPTÍDEO pVTK DE  
LIGAÇÃO À HIDROXIAPATITA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador(es): Carlos Nelson Elias, Marcelo Henrique Prado da Silva e Álvaro José Boareto Mendes.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2024, pela seguinte banca examinadora:



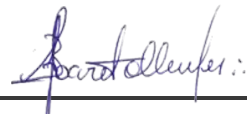
---

Prof. Carlos Nelson Elias - D.C. do IME - Presidente



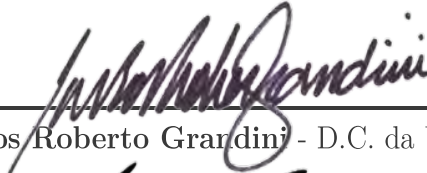
---

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva - D.C. do IME



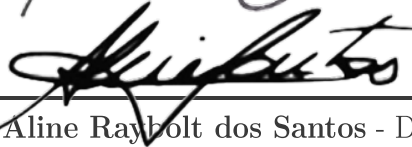
---

Prof. Álvaro José Boareto Mendes - D.C. do IME



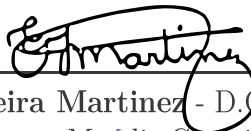
---

Prof. Carlos Roberto Grandini - D.C. da UNESP Bauru



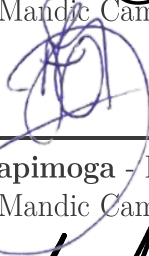
---

Profa. Aline Raybolt dos Santos - D.C. da UFRJ



---

Profa. Elizabeth Ferreira Martinez - D.C. da Universidade São Leopoldo  
Mandic Campinas



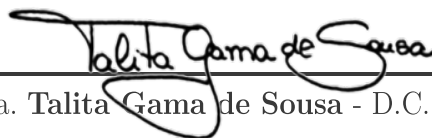
---

Prof. Marcelo Henrique Napimoga - D.C. da Universidade São Leopoldo  
Mandic Campinas



---

Profa. Anderson dos Santos Paula - D.C. do IME



---

Profa. Talita Gama de Sousa - D.C. do IME

Rio de Janeiro

2024

*Este trabalho é dedicado à minha esposa Raquel, meu único e verdadeiro amor, há 24 anos, sempre ao meu lado e com quem construí tudo que tenho e sou atualmente. Juntos e com nossos filhos, Lucas e Bento, estamos sempre rodeados de um amor incondicional, e mesmo diante do desafio diário de sermos uma família especial, tenho a segurança que estaremos lado à lado até o meu último dia.*

*"You will never walk alone"  
Gerry and The Pacemakers*

# AGRADECIMENTOS

Neste momento de conclusão desta jornada acadêmica, desejo expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que desempenharam papéis fundamentais em minha trajetória. Cada um de vocês, de maneira única e significativa, contribuiu para o sucesso deste trabalho e para o enriquecimento da minha vida acadêmica e pessoal.

Primeiramente, agradeço a Deus por Sua graça e orientação durante toda esta jornada. Sua presença e guia constante foram a força que me impulsionou e me sustentou ao longo dos desafios e conquistas.

À minha amada esposa, Raquel, meu amor inabalável há 24 anos, dedico uma parte especial deste trabalho. Sua presença constante, amor incondicional e apoio incansável foram a base sólida sobre a qual construí tudo o que tenho e sou hoje. Com nossos filhos, Lucas e Bento, nossa família é cercada por um amor incondicional que nos fortalece a cada dia.

Ao meu orientador, Prof. Carlos Nelson Elias, sou imensamente grato por sua sabedoria e visão pioneira, que possibilitaram que um Oficial Dentista do Exército realizasse o curso de Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais no Instituto Militar de Engenharia. Seu apoio e crença em mim foram determinantes para a concretização deste sonho acadêmico que há muito almejava.

Ao coorientador Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva, agradeço por sua orientação sólida, apoio constante e sabedoria ao longo deste processo. Sua presença foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Álvaro Boareto, agradeço por sua paciência, conhecimento, amizade e por abrir as portas do laboratório de Processos Biotecnológicos - SE/5 para auxiliar na minha pesquisa. Sua generosidade e apoio foram cruciais para o progresso deste projeto.

Ao Prof. Daniel Navarro e à equipe do Instituto de Células-Tronco R-Crio em Campinas, expresso minha gratidão por todo apoio e principalmente por permitirem que parte fundamental do meu experimento fosse realizada neste Instituto.

À minha querida amiga Andrea Costa, pós-doutoranda do CBPF, a quem agradeço pelo carinho e pela contribuição fundamental na análise e interpretação de alguns resultados de testes realizados no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas.

A todos os professores do departamento de Ciências de Materiais do Instituto Militar de Engenharia, minha sincera gratidão por sua dedicação ao ensino e formação acadêmica.

Aos amigos do laboratório de Biomateriais - SE-8 e a todos os demais discentes

do IME que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal, minha sincera gratidão. Em especial, aos amigos mais próximos, Maj Adriana Marcela, Maj Roni, Cap Renata Lorusso, cap Dárcia, Cap Ana Karine, Alessandro Brito, Bruno Martins, Nathalia Habib, Roberto Monteiro, Marcos Paulo, Caio Wichrowski, Marvin do Nascimento, Shanely Ribeiro e Marcela Rabelo por estarem ao meu lado nesta jornada.

A cada um de vocês, meu mais profundo agradecimento. Este trabalho é o resultado do esforço coletivo e do apoio que recebi ao longo dos anos. Que esta tese de doutorado seja uma expressão modesta do meu apreço e gratidão por cada um de vocês.



## RESUMO

A funcionalização da superfície de titânio com peptídeos tem se destacado como uma estratégia promissora para melhorar a interação entre o material e o ambiente biológico, contribuindo para o sucesso de procedimentos clínicos. O objetivo do presente trabalho é analisar a funcionalização de superfícies microrrugosas de titânio por meio da imobilização do peptídeo de ligação à hidroxiapatita pVTK, utilizando a técnica de silanização. Essa abordagem inovadora visa a interação entre o titânio e o ambiente biológico, especialmente em relação à bioatividade. Foram preparadas 76 amostras de titânio comercialmente puro grau 4, distribuídas em quatro grupos. O primeiro grupo, denominado controle negativo (Ti), consistiu em amostras de titânio sem tratamento, ou seja, sem silanização e sem imobilização do peptídeo pVTK. O segundo grupo incluiu amostras que passaram pelo processo de silanização (TiSi). O terceiro grupo (TiP), compreendeu amostras que não foram silanizadas, mas receberam a imobilização do peptídeo pVTK. O quarto grupo (TiSiP) consistiu em amostras que foram submetidas tanto à silanização quanto à imobilização do pVTK. A imobilização do peptídeo pVTK foi realizada em um ambiente controlado e envolveu o gotejamento de uma solução contendo o peptídeo pVTK com uma concentração de 0,4mM, dissolvido em tampão fosfato-salino (PBS). Após a funcionalização, as amostras foram submetidas a testes de biocompatibilidade *in vitro*, permanecendo imersas em meio MCCOY'S 5A por até 14 dias. A análise das superfícies foi por meio de Microscópio Eletrônico de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG). A caracterização química foi realizada através de Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS) e Espectrometria por Fluorescência de Raios X (FRX), para identificar e quantificar dos elementos presentes nas superfícies. Os resultados obtidos revelaram que a produção da camada superficial de apatita, um componente fundamental para a bioatividade das superfícies, esteve predominantemente associada aos grupos que passaram pelo processo de silanização (TiSi e TiSiP). Observou-se que houve a redução da precipitação de apatita nas superfícies de titânio silanizado quando funcionalizadas com o peptídeo pVTK. Os testes de biocompatibilidade *in vitro* realizados são capazes de fornecer informações sobre como as superfícies funcionalizadas podem se comportar no ambiente biológico *in vivo*. Embora os testes realizados forneçam informações significativas, é fundamental reconhecer que o ambiente *in vivo* é extremamente complexo e dinâmico, e as respostas podem variar consideravelmente. Apesar do presente estudo fornecer informações sobre o comportamento dos biomateriais, é importante realizar testes *in vivo* para futuras aplicações clínicas.

**Palavras-chave:** biomateriais; funcionalização; peptídeo; bioatividade; titânio.

## ABSTRACT

The functionalization of titanium surfaces with peptides has emerged as a promising strategy to enhance the interaction between the material and the biological environment, contributing to the success of clinical procedures. The aim of this study is to analyze the functionalization of micro-rough titanium surfaces through the immobilization of the hydroxyapatite-binding peptide pVTK using the silanization technique. This innovative approach aims at promoting the interaction between titanium and the biological environment, especially concerning bioactivity. A total of 76 commercially pure titanium grade 4 samples were prepared and divided into four groups. The first group, named negative control (Ti), consisted of untreated titanium samples, i.e., without silanization and without the immobilization of the pVTK peptide. The second group included samples that underwent the silanization process (TiSi). The third group (TiP) comprised samples that were not silanized but received the immobilization of the pVTK peptide. The fourth group (TiSiP) consisted of samples subjected to both silanization and pVTK immobilization. The immobilization of the pVTK peptide was carried out in a controlled environment and involved the dripping of a solution containing the pVTK peptide at a concentration of 0.4 mM, dissolved in phosphate-buffered saline (PBS). After functionalization, the samples were subjected to *in vitro* biocompatibility tests, remaining immersed in MCCOY'S 5A medium for up to 14 days. Surface analysis was performed using a Field Emission Scanning Electron Microscope (FEG-SEM). Chemical characterization was conducted using Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) and X-ray Fluorescence Spectrometry (XRF), to identify and quantify the elements present on the surfaces. The results obtained revealed that the production of the apatite surface layer, a fundamental component for surface bioactivity, was predominantly associated with the groups that underwent the silanization process (TiSi and TiSiP). It was observed that there was a reduction in apatite precipitation on silanized titanium surfaces when functionalized with the pVTK peptide. *In vitro* biocompatibility tests can provide insights into how functionalized surfaces may behave in the *in vivo* biological environment. However, it is essential to recognize that the *in vivo* environment is extremely complex and dynamic, and responses may vary considerably. Despite the valuable information provided by the present study regarding the behavior of biomaterials, conducting *in vivo* tests is crucial for future clinical applications.

**Keywords:** biomaterials; functionalization; peptide; bioactivity; titanium.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de substratos de titânio com diferentes tratamentos de superfície. SLA: jateamento de partículas seguido de ataque ácido; e ASD: Ti anodizado. . . . .	24
Figura 2 – Interação da superfície osso-implante em diferentes rugosidades e condições topográficas . . . . .	26
Figura 3 – Diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos . . . . .	30
Figura 4 – Interação osteoblastos / osteoclastos . . . . .	30
Figura 5 – Processo de mineralização. Teorias gerais que explicam a deposição de biominaerais . . . . .	32
Figura 6 – Ciclo celular do osteoblasto instruído por produtos bioativos de dissolução iônica liberados por biovidro . . . . .	33
Figura 7 – Gerações dos Biomateriais . . . . .	34
Figura 8 – Titanato de sódio amorfo no processo de formação de apatita em sua superfície em um SBF . . . . .	36
Figura 9 – Estrutura secundária de peptídeos de ligação à hidroxiapatita . . . . .	39
Figura 10 – Precipitação e crescimentos de cristais de HAp x HBPs . . . . .	40
Figura 11 – Amostras dos grupos TiSi e TiSiP ativadas após secagem em $N_2$ . . . . .	43
Figura 12 – Silanização das amostras dos grupos TiSi e TiSiP em atmosfera saturada de $N_2$ . . . . .	45
Figura 13 – Representação esquemática da imobilização do pVTK na superfície de titânio através do Método de Silanização . . . . .	46
Figura 14 – Imagem 3D da microtopografia da superfície da amostra após condicionamento ácido - Interferômetro <i>Zygo</i> . . . . .	50
Figura 15 – Imagem 3D da microtopografia da superfície da amostra após tratamento alcalino e silanização - Interferômetro <i>Zygo</i> . . . . .	51
Figura 16 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após condicionamento ácido. Aumento de 500X, 1000X, 5000X e 10000X . . . . .	54
Figura 17 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após condicionamento ácido. Aumento de 20000X . . . . .	55
Figura 18 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após tratamento alcalino. Aumento de 500X, 1000X, 5000X e 10000X . . . . .	58
Figura 19 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após tratamento alcalino. Aumento de 20000X . . . . .	59
Figura 20 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após tratamento alcalino. Aumento de 500X, 1000X, 5000X e 10000X . . . . .	60

Figura 21 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após tratamento alcalino. Aumento de 20000X . . . . .	61
Figura 22 – Imagem das análises de Medida do Ângulo de Contato e Molhabilidade realizadas nas superfícies das amostras nos estágios inicial (A), intermediário (B) e final (C) do processo de silanização . . . . .	62
Figura 23 – Espectros de Fluorescência de Raios X comparando picos de silício (Si) em amostras dos grupos Ti e TiSi (A), e fósforo (P) em amostras dos grupos TiSiP e TiSi (B). . . . .	66
Figura 24 – Espectros de Fluorescência de Raios X comparando picos de fósforo (P) em amostras dos grupos TiSi e TiP (A), e silício (Si) em amostras dos grupos TiSiP e TiP (B). . . . .	67
Figura 25 – Teste de Citotoxicidade. Percentual de células viáveis após exposição 24 h (A) e 48 h (B) ao extrato. . . . .	69
Figura 26 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo controle negativo (grupo Ti) após 14 dias em Meio McCoy. . . . .	71
Figura 27 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo experimental TiP após 14 dias em Meio McCoy. . . . .	72
Figura 28 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo controle positivo TiSi após 14 dias em Meio McCoy - 1250X. . . . .	73
Figura 29 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo controle positivo TiSi após 14 dias em Meio McCoy - 10.000X. . . . .	74
Figura 30 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo experimental TiSiP após 14 dias em Meio McCoy - Região 1. . . . .	76
Figura 31 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo experimental TiSiP após 14 dias em Meio McCoy - Região 2. . . . .	76
Figura 32 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 500X. . . . .	78
Figura 33 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 1000X. . . . .	79
Figura 34 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 5000X. . . . .	80
Figura 35 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 10000X. . . . .	81
Figura 36 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 20000X. . . . .	82
Figura 37 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 500X. . . . .	83
Figura 38 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 1000X. . . . .	84

- Figura 39 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 5000X. 85
- Figura 40 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 10000X. 86
- Figura 41 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 20000X. 87
- Figura 42 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 500X. 89
- Figura 43 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 1000X. 90
- Figura 44 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 5000X. 91
- Figura 45 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 10000X. 92
- Figura 46 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 20000X. 93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetro Ra para as principais técnicas de modificação da rugosidade superficial do titânio . . . . .	26
Tabela 2 – Carga líquida ( <i>Net Charge</i> ) de peptídeos de ligação à HAp . . . . .	39
Tabela 3 – Afinidade de Ligação dos HBPs . . . . .	40
Tabela 4 – Grupos Estabelecidos para o Teste de Bioatividade . . . . .	42
Tabela 5 – Parâmetros de rugosidade da superfície da amostra após condicionamento ácido - Interferômetro <i>Zygo</i> . . . . .	51
Tabela 6 – Parâmetros de rugosidade da superfície da amostra após tratamento alcalino - Interferômetro <i>Zygo</i> . . . . .	51
Tabela 7 – Parâmetros de rugosidade da superfície da amostra após silanização - Interferômetro <i>Zygo</i> . . . . .	52
Tabela 8 – Valores médios dos parâmetros de rugosidade observados em diferentes regiões das superfícies ao longo das três etapas do processo de preparação das amostras. - Interferômetro <i>Zygo</i> . . . . .	52
Tabela 9 – Percentual (%) em massa dos componentes da superfície das amostras em Espectrometria por Fluorescência de Raios X – Panalytical Epsilon-3 . . . . .	65
Tabela 10 – Caracterização química (EDS) da superfície da amostra do grupo controle negativo (grupo Ti) após 14 dias em Meio McCoy. . . . .	71
Tabela 11 – Caracterização química (EDS) da superfície da amostra do grupo experimental TiP após 14 dias em Meio McCoy. . . . .	72
Tabela 12 – Caracterização química (EDS) da superfície da amostra do grupo controle positivo (grupo TiSi) após 14 dias em Meio McCoy - 1250X. . . . .	74
Tabela 13 – Caracterização química (EDS) da superfície da amostra do grupo controle positivo (grupo TiSi) após 14 dias em Meio McCoy - 10.000X. . . . .	75
Tabela 14 – Caracterização química (EDS) da superfície da amostra do grupo experimental (grupo TiSiP) após 14 dias em Meio McCoy - 1250X e 10.000X. . . . .	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
MEV-FEG	<i>Field Emission Scanning Electron Microscope</i> (Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo)
EDS	<i>Energy Dispersive X – ray Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia)
HAp	Hidroxiapatita
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i> (Fluido Corporal Simulado)
HBP	<i>Hydroxiapatite – Binding Peptide</i> (Peptídeo de Ligação à Hidroxiapatita)
SLA	<i>Sandblasted and Acid Etched</i> (Jateamento de Partículas e Ataque Ácido)
ASD	<i>Anodic Spark Deposition</i> (Deposição de Faísca Anódica)
MEC	Matriz Extracelular
CaP	Fosfato de Cálcio
NCP	<i>Non Collagen Protein</i> (Proteína Não Colágena)
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína Óssea Morfogénica)
BSP	<i>Bone SialoProtein</i> (Sialoproteína Óssea)
ON	Osteonectina
SPARC	Proteína Secretada Ácida, Rica em Cisteína
OP	Osteopontina
OC	Osteocalcina
RANKL	Ligante Ativador do Receptor do Fator Nuclear $\kappa\beta$
cFms	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
NF-Kappa $\beta$	Fator Nuclear $\kappa\beta$
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)

TRAF6	Fator 6 Associado ao Receptor do Fator de Necrose Tumoral
OPG	Osteoprotegerina
CPA	<i>Crystallization by Particle Attachment</i> (Cristalização por Fixação de Partícula)
BLM	<i>Bone – like Mineral</i> (Mineral Semelhante ao Osso)
CPTES	3(cloropropil)-trietoxissilano
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
FRX	Espectrometria por Fluorescência de Raios X



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	18
1.2	OBJETIVOS	21
1.2.1	OBJETIVO GERAL	21
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>23</b>
2.1	MICROTOPOGRAFIA DE SUPERFÍCIE	23
2.2	MINERALIZAÇÃO ÓSSEA	26
2.2.1	HIDROXIAPATITA	27
2.2.2	COMPONENTES MOLECULARES DO OSSO	28
2.2.3	COMPONENTES CELULARES DO OSSO	29
2.3	BIOMINERALIZAÇÃO	31
2.4	SUPERFÍCIES METÁLICAS BIOATIVAS	31
2.5	PEPTÍDEOS DE LIGAÇÃO À HIDROXIAPATITA	35
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
3.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	42
3.1.1	UNIFORMIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES	42
3.1.2	ATIVAÇÃO DAS AMOSTRAS	43
3.1.3	SILANIZAÇÃO	44
3.1.4	IMOBILIZAÇÃO DO PEPTÍDEO PVTK	45
3.2	RUGOSIDADE SUPERFICIAL E MOLHABILIDADE	46
3.3	TESTES <i>in vitro</i>	47
3.3.1	TESTES DE BIOATIVIDADE	47
3.3.2	TESTES DE VIABILIDADE CELULAR	47
3.4	CARCTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DAS AMOSTRAS	48
3.4.1	COMPROVAÇÃO DA UNIÃO TITÂNIO-SILANO, SILANO-PVTK E TITÂNIO-PVTK	48
3.4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS AMOSTRAS APÓS O TESTE DE BIOATIVIDADE	48
3.4.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS APÓS O TESTE DE BIOATIVIDADE	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
4.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	50

4.2	ENSAIOS APÓS A INCORPORAÇÃO DO PVTK . . . . .	63
4.2.1	ESPECTROMETRIA POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (FRX) . . . . .	64
4.2.2	TESTE DE CITOTOXICIDADE / VIABILIDADE CELULAR . . . . .	68
4.2.3	ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS) . . . . .	70
4.2.4	MORFOLOGIA APÓS IMERSÃO EM MEIO MCCOY . . . . .	77
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO . . . . .</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS DE PESQUISA . . . . .</b>	<b>95</b>
	<b>REFERÊNCIAS . . . . .</b>	<b>97</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Contextualização

As constantes pesquisas para o desenvolvimento de novos biomateriais e aprimoramento de superfícies desempenham um papel de extrema relevância para a engenharia biomédica e medicina regenerativa. Em um mundo onde a expectativa de vida está aumentando e a demanda por tratamentos ortopédicos e odontológicos está crescendo, a necessidade de aprimorar a osseointegração de implantes se torna ainda mais premente. Isso se configura como um fator determinante para garantir o sucesso de longo prazo desses dispositivos médicos. A formação de uma camada de apatita com semelhança à estrutura óssea nas superfícies dos implantes emerge como um objetivo de alta relevância, uma vez que essa camada promove uma ligação direta e estável entre o implante e o tecido ósseo circundante, o que amplifica a eficácia e a durabilidade desses implantes.

No âmbito da substituição de tecidos duros, os materiais metálicos se destacam como preferenciais em relação aos materiais cerâmicos ou poliméricos, graças às suas propriedades mecânicas e estabilidade química em ambientes fisiológicos, que desempenham um papel crucial na redução do risco de fraturas e complicações pós-operatórias. (1). Entre os biomateriais empregados em implantes ósseos, o titânio comercialmente puro e suas ligas se sobressaem como os mais utilizados. Esses biomateriais apresentam uma combinação única de características, que incluem propriedades mecânicas, biocompatibilidade, resistência à corrosão, alta resistência à tração, compressão e flexão, módulo de elasticidade relativamente inferior em comparação com outros metais, boa conformabilidade e usinabilidade. Além disso, por meio de tratamentos superficiais, é possível conferir às superfícies dos implantes a rugosidade adequada, energia de superfície e molhabilidade com propriedades que favorecem a adesão, fixação e proliferação celular, contribuindo assim para a promoção eficaz da osseointegração (2).

A interação entre implantes de titânio (Ti) e os tecidos circundantes representa um fator crítico para o alcance do sucesso e da estabilidade a longo prazo (3). Uma série de estudos tem demonstrado de forma consistente que as propriedades superficiais dos implantes desempenham um papel fundamental para o desempenho tanto a curto quanto a longo prazo (4, 5). Para atender à crescente demanda por tratamentos ortopédicos e odontológicos, têm sido aplicadas diversas estratégias de modificação nas superfícies dos implantes endo-ósseos. Essas estratégias visam não apenas facilitar a cicatrização óssea, mas também permitir a aplicação de carga nos implantes em um período reduzido. Tais modificações frequentemente envolvem alterações na composição química e morfologia das superfícies, com o propósito de estimular reações biológicas mais favoráveis e acelerar o

processo de recuperação (6).

Entre as pesquisas que envolvem melhorias das superfícies dos implantes, merece destaque a funcionalização com materiais bioativos. Entre esses materiais, destaca-se a hidroxiapatita,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , devido à sua reconhecida semelhança com os fosfatos de cálcio presentes na fase mineral óssea (7). A busca incessante pelo aprimoramento contínuo desses revestimentos e pela compreensão de seu impacto nas interações biológicas é de suma importância para o avanço da engenharia biomédica.

Os ortofosfatos de cálcio desempenham um papel de extrema importância, pois constituem a componente inorgânica fundamental dos tecidos calcificados normais, como os ossos e dentes. Esse mineral é essencial para a integridade e a resistência mecânica desses tecidos, sendo um elemento crucial para a saúde e a funcionalidade do sistema esquelético. A regulação da mineralização *in vivo* desses ortofosfatos de cálcio está intimamente relacionada a uma ampla gama de processos patológicos que afetam o corpo humano. Um exemplo destacado é a arterosclerose, uma condição grave resultante da obstrução de vasos sanguíneos devido à formação de depósitos sólidos de colesterol que contêm ortofosfatos de cálcio. Isso pode levar a sérias complicações e aumento do risco à eventos cardiovasculares. Além disso, a osteoporose, uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, é caracterizada pela descalcificação parcial dos ossos. Isso leva à substituição gradual de uma apatita biológica, menos solúvel e mais dura, por hidrogenofosfatos de cálcio mais solúveis e macios. A osteoporose é uma condição debilitante que aumenta o risco de fraturas ósseas e compromete a qualidade de vida dos pacientes. No entanto, apesar dessas associações com patologias, a grande semelhança química dos ortofosfatos de cálcio com os tecidos biológicos calcificados confere-lhes notável biocompatibilidade e bioatividade. Isso significa que esses materiais têm a capacidade única de interagir de forma harmoniosa com os sistemas biológicos, o que é essencial em aplicações médicas, como implantes ortopédicos e dentários (8).

Na área de biomateriais, os biomateriais metálicos ou metais biocompatíveis, são tradicionalmente considerados bioinertes. No entanto, o titânio metálico, amplamente utilizado em implantes, pode ser transformado em um material osteocondutor por meio de tratamentos químicos e térmicos específicos. Essa conversão torna o titânio bioativo, o que é crucial para sua aplicação em implantes ortopédicos e odontológicos. O titânio bioativo exibe capacidade de formação de apatita *in vitro* e, o que é ainda mais relevante, ao permitir uma ligação com o osso *in vivo*, contribuindo significativamente para o sucesso de implantes a longo prazo (7).

Apesar da importância do titânio bioativo, a literatura científica apresenta perspectivas divergentes quanto aos benefícios do revestimento de implantes com hidroxiapatita (HAp), bem como às implicações de sua reabsorção na sobrevivência de implantes a longo prazo (9). Alguns estudos sugerem vantagens na aplicação do revestimento de HAp,

argumentando que ele melhora a morfologia da superfície de titânio e estimula a fixação de osteoblastos. Outros destacam que a dissolução do revestimento ocorre devido à sua frágil estrutura cristalina, resultando em uma diminuição na aderência à superfície do titânio e eventual falha tardia do implante (10). Os resultados divergentes exigem investigações para compreender a influência do revestimento de HAp na biofuncionalização de implantes de titânio e suas implicações clínicas.

Estudos na literatura revelam os resultados de pesquisas relacionadas à deposição de revestimentos de cerâmicas bioativas sobre substratos metálicos. Entre essas técnicas, destacam-se métodos como a pulverização por plasma, a deposição eletroforética, a deposição eletroquímica. No entanto, a falta de uniformidade na espessura do filme e a baixa qualidade da adesão do revestimento cerâmico ao substrato metálico têm sido responsáveis por inúmeras falhas na aplicação desses materiais (11).

Estudos como o de Fujibayashi et al. (2004) demonstraram que um metal insolúvel, desprovido de cálcio ou fósforo, pode adquirir propriedades osteoindutoras quando submetido a tratamentos que promovem a formação de macroestruturas e microestruturas adequadas, mesmo sem a necessidade de células osteogênicas adicionais ou agentes osteoindutores (12).

A adesão do osso é um processo crucial que se desencadeia mediante uma rápida série de reações químicas que ocorrem na superfície de implantes revestidos quando são inseridos nos tecidos vivos. No âmbito da substituição ou regeneração de tecidos, é de extrema importância que os materiais bioativos empregados apresentem uma cinética de liberação química cuidadosamente regulada, que esteja em perfeita sintonia com as sequências de mudanças celulares que ocorrem durante o processo de reparação de feridas (13). Essa harmonização desempenha um papel fundamental na garantia do êxito dos implantes e na sua efetiva integração com o tecido circundante.

Um critério fundamental para assegurar a eficaz integração de um material artificial com o osso vivo é a capacidade de promover a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa, que seja semelhante à composição do osso, em sua superfície após a inserção no organismo. A formação *in vivo* de apatita em cerâmicas bioativas é um processo crucial, cuja replicação pode ser realizada em um meio de teste conhecido como fluido corporal simulado (SBF), o qual é um líquido acelular e desprovido de proteínas, cuja composição iônica se assemelha à do plasma sanguíneo humano. Portanto, a avaliação da bioatividade de um material artificial pode ser conduzida mediante a análise da formação de apatita em sua superfície quando submerso em SBF. Esta avaliação rigorosa da bioatividade de materiais é essencial para compreender seu potencial de interação com o ambiente biológico e, por conseguinte, para o desenvolvimento de biomateriais que sejam capazes de promover a osseointegração efetiva em aplicações clínicas (14, 15).

A perspectiva de regular a mineralização de fosfato de cálcio por meio da intervenção

de peptídeos de ligação à hidroxiapatita (*Hydroxyapatite – Binding Peptides* - HBPs) tem recebido crescente destaque na pesquisa, como evidenciado em estudos anteriores. (16, 17). Essa abordagem tem demonstrado resultados promissores, embora, em alguns casos, a literatura apresente achados contraditórios. Enquanto determinadas pesquisas apontam para uma facilitação na formação de fosfato de cálcio, devido à influência positiva exercida pelas HBPs, o que pode potencialmente beneficiar a criação de uma camada de apatita semelhante à do osso em superfícies funcionalizadas com esses peptídeos (18); outros estudos sugerem uma regulação negativa da ação das células osteoblásticas e, conseqüentemente, da mineralização óssea, abrindo perspectivas adicionais para a aplicação desses peptídeos em biomateriais (19, 20, 21).

Este estudo tem como objetivo avaliar a bioatividade de uma nova superfície resultante da imobilização de um peptídeo de ligação à hidroxiapatita (*Hydroxyapatite – Binding Peptide* - HBP) e realizar testes *in vitro* para analisar tanto a bioatividade quanto a viabilidade celular dessa superfície. Essa pesquisa busca contribuir significativamente para o avanço no entendimento e desenvolvimento de materiais bioativos e revestimentos de implantes que promovam uma adesão eficaz e duradoura ao osso vivo, aumentando assim a eficácia e a segurança desses biomateriais.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é investigar o impacto da imobilização do peptídeo de ligação à hidroxiapatita pVTK em superfícies microrrugosas de óxido de titânio, tanto na ausência quanto na presença de uma etapa prévia de bioativação por tratamento alcalino.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar e comparar a rugosidade e a molhabilidade das superfícies de óxido de titânio após cada uma das três etapas de preparação das amostras (condicionamento ácido, tratamento alcalino com *NaOH* e silanização).

Realizar a biofuncionalização da superfície de titânio, com e sem silanização, por meio da imobilização do peptídeo pVTK.

Avaliar a eficácia da deposição do peptídeo pVTK na superfície de titânio com e sem silanização.

Avaliar através de testes *in vitro* a viabilidade celular do peptídeo de ligação à hidroxiapatita pVTK imobilizado na superfície de óxido de titânio.

Caracterizar quimicamente a superfície do titânio funcionalizado com peptídeo pVTK após imersão em meio McCoy.

Analisar a morfologia da superfície do titânio funcionalizado com peptídeo pVTK após imersão em meio McCoy.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Microtopografia de Superfície

Na literatura especializada, é amplamente reconhecido que, durante o processo de instalação de um implante de titânio, ocorre uma resistência à rotação, principalmente devido ao atrito gerado entre o implante e o tecido ósseo circundante. A magnitude dessa resistência está diretamente relacionada à estabilidade primária do implante. É relevante destacar que essa retenção mecânica não é afetada pelo material do implante em si, mas sim por diversos fatores relacionados ao design do implante e às características da superfície. Estes incluem, mas não se limitam a, sua rugosidade, dimensões do furo, presença de ranhuras, a geometria da rosca e o número de filetes (22).

Contudo, é importante ressaltar que, nas semanas subsequentes à inserção do implante, a estabilidade primária tende a diminuir. Esse declínio gradual é uma consequência das interações complexas entre a superfície do implante e o tecido ósseo circundante. À medida que o tempo avança, essas interações culminam no desenvolvimento progressivo de uma estabilidade secundária, que se torna cada vez mais significativa e vital para o sucesso a longo prazo da osseointegração (2).

A macrogeometria do implante desempenha um papel crucial na determinação da estabilidade primária. Logo após a instalação do implante, uma série de eventos é desencadeada, envolvendo a interação de numerosos elementos celulares com a superfície do dispositivo. Essa interação é o ponto de partida para o processo complexo que levará à osseointegração bem-sucedida. É importante destacar que a macrogeometria do implante, incluindo sua forma e dimensões, exerce uma influência significativa nesses mecanismos biológicos. Além disso, a superfície do implante, incluindo sua composição química e rugosidade micrométrica, desempenha um papel fundamental nesse processo, pois as células reagem de maneira distinta ao interagirem com superfícies lisas em comparação com superfícies rugosas (23).

Para otimizar a osseointegração e melhorar os resultados clínicos, várias técnicas de modificação da superfície dos implantes osseointegráveis foram desenvolvidas. Estas técnicas incluem tanto métodos subtrativos quanto aditivos. Entre os métodos mais amplamente utilizados estão o jateamento de partículas seguido por tratamento de ataque ácido (SLA) e a anodização (ASD) (Figura 1). Essas abordagens têm o objetivo de aumentar a rugosidade da superfície, o que, por sua vez, tem sido associado a uma cicatrização mais rápida e a potencial redução dos tempos necessários para a aplicação de carga nos implantes. No



entanto, é importante ressaltar que cada método de modificação da superfície produz características topográficas ligeiramente distintas, mesmo quando suas médias aritméticas de rugosidade (Ra) podem apresentar valores semelhantes. Além disso, essas modificações na superfície do implante também podem afetar a molhabilidade e as características químicas, o que, por sua vez, pode ter um impacto significativo na resposta celular inicial ao material implantado (24).

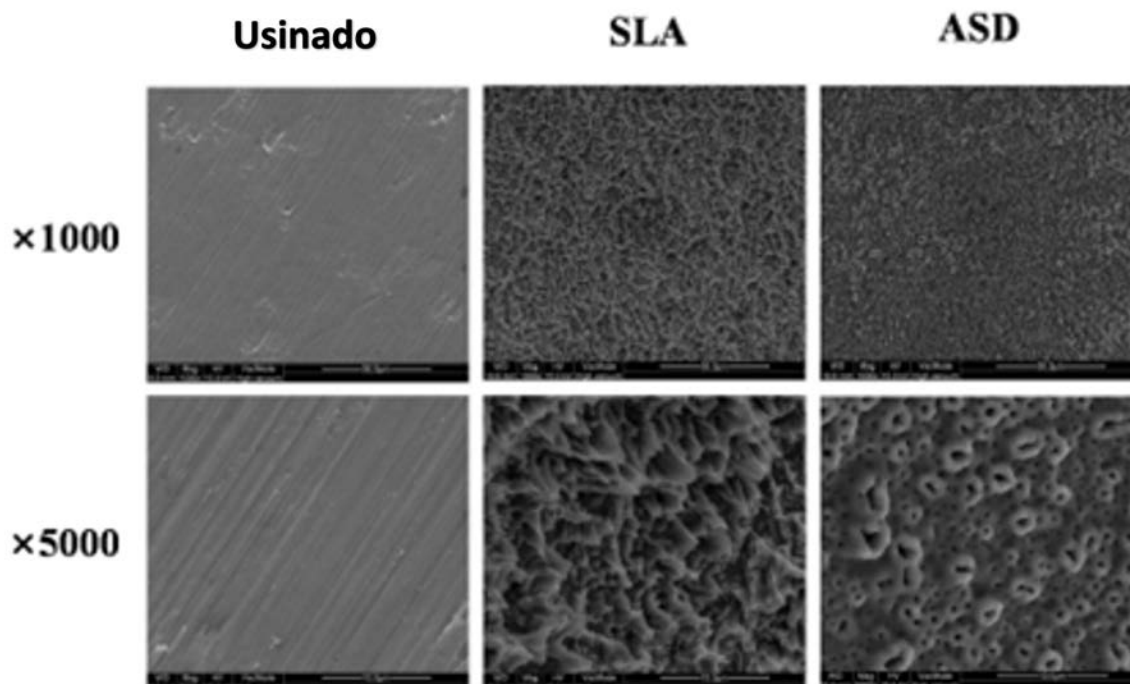


Figura 1 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de substratos de titânio com diferentes tratamentos de superfície. SLA: jateamento de partículas seguido de ataque ácido; e ASD: Ti anodizado. Adaptado de KIM et al. (2015). (25)

A interação entre a superfície dos implantes de titânio e os tecidos circundantes desempenha um papel fundamental na garantia do sucesso e da estabilidade a longo prazo desses dispositivos biomédicos (26). Em muitos estudos encontrados na literatura que buscam analisar o impacto da rugosidade na osseointegração, é comum a utilização convencional do parâmetro Ra como medida de rugosidade. Além disso, alguns desses estudos estabelecem correlações entre o valor de Ra e outras propriedades da superfície do implante, como sua molhabilidade (27), a capacidade de adesão das células *in vitro* e a adsorção de proteínas. No entanto, a escolha do Ra como único parâmetro de análise de rugosidade carece de justificativa adequada, uma vez que a avaliação isolada desse parâmetro não representa uma análise abrangente da morfologia da superfície. Deve-se considerar que superfícies com valores similares de Ra podem exibir morfologias distintas.

Portanto, é fundamental a necessidade de correlacionar diversos parâmetros que caracterizam a rugosidade e avaliar como eles interferem nas outras propriedades da superfície dos implantes. No entanto, apesar de haver uma ampla variedade de parâmetros disponíveis para a análise e caracterização da rugosidade, o papel específico de cada um desses parâmetros na osseointegração ainda não está definitivamente estabelecido (28). Para obter uma avaliação mais precisa da rugosidade e da adesão celular, é aconselhável considerar a combinação dos valores de pelo menos um parâmetro de altura, um espacial e um híbrido (29).

A rugosidade de superfície pode ser subdividida em três níveis, cada um com características distintas e impacto na osseointegração, dependendo da escala dos recursos envolvidos: macro, micro e nano (30). O parâmetro Ra de rugosidade micrométrica das superfícies dos implantes osseointegráveis geralmente varia na faixa de 1 a 10  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Essa faixa de rugosidade é especialmente eficaz na promoção do intertravamento entre o osso mineralizado e a superfície do implante. As irregularidades presentes nesses implantes permitem que células osteogênicas se conectem e depositem osso, contribuindo para a formação da interface osso-implante. Portanto, pode-se afirmar que as microrrugosidades atuam diretamente no nível celular da osseointegração (31).

Alguns estudos têm destacado que perfis de superfície em nanoescala, com características semelhantes às encontradas em receptores e proteínas de membrana, desempenham um papel relevante na adsorção de proteínas, na adesão de células osteoblásticas e na taxa de osseointegração (Figura 2). Acredita-se que, em nível nanométrico, os receptores de membrana celular, como integrinas e proteínas, contribuam para a melhoria da qualidade geral da osseointegração e de outras respostas biológicas entre o osso e o implante (32). No entanto, é importante observar que a criação de superfícies com rugosidade nanométrica é um desafio, muitas vezes exigindo métodos complexos e tratamentos químicos específicos. Além disso, ainda não se definiu qual é a nanotopografia de superfície ideal para promover a adsorção seletiva de proteínas, resultando na adesão de células osteoblásticas e deposição óssea rápida (31). Portanto, a pesquisa em novas tecnologias de nanopadrões é essencial, pois pode abrir novas perspectivas para traduzir os resultados desses estudos em aplicações clínicas mais amplas e eficazes (33).

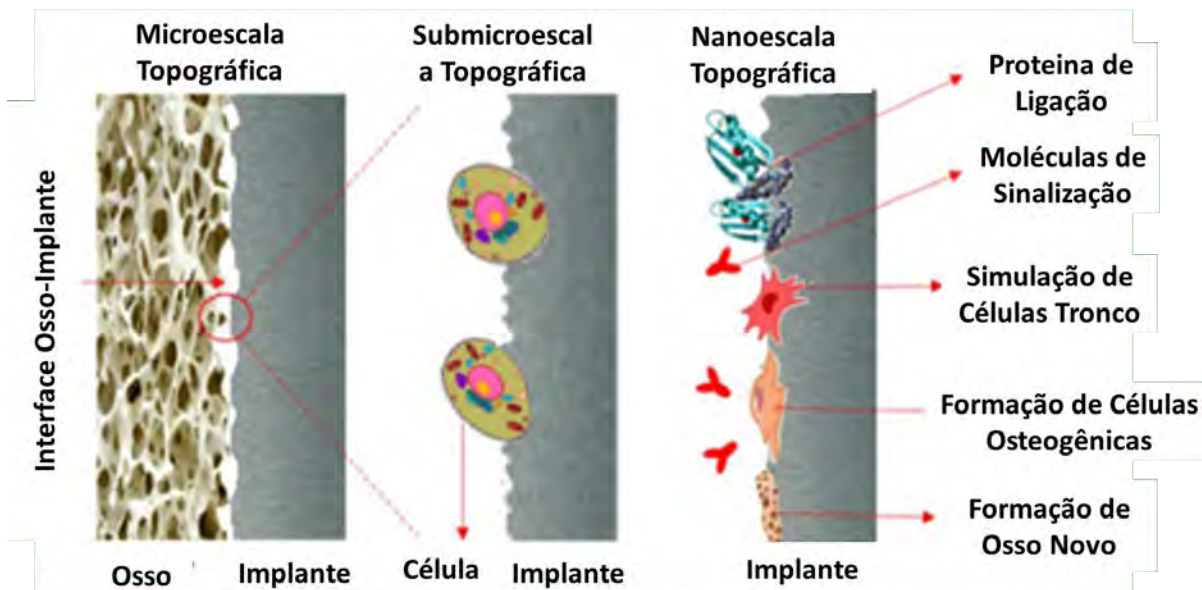


Figura 2 – Interação da superfície osso-implante em diferentes rugosidades e condições topográficas. Adaptado de LI et al. (2021). (32)

Tabela 1 – Parâmetro Ra para as principais técnicas de modificação da rugosidade superficial do titânio. Adaptado de GUÉHENNEC et al. (2007). (31)

Tipo de Implante	Rugosidade da Superfície ( $\mu\text{m}$ )
Ti Cp	Ra = 0,22
TPS	Ra = 7,01
SLA	Ra = 1,15
SLA Modificado	Ra = 1,16
Revestimento HAp	Ra = 1,06
Revestimento biomimético de CaP	Ra = 1,83

## 2.2 Mineralização Óssea

A mineralização óssea é um processo no qual os cristais minerais são depositados de maneira organizada na matriz extracelular orgânica (MEC). A MEC serve como um molde que contém células responsáveis por guiar a mineralização, desde o local inicial até as dimensões finais dos cristais (34).

O osso é um tecido dinâmico e altamente vascularizado, composto por aproximadamente 70% de minerais, predominantemente cristais de hidroxiapatita (HAp) em nanoescala, e cerca de 30% de material orgânico. Esse material orgânico inclui componentes como colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e sialoproteínas (35).

Uma vez que o osso é o principal elemento de sustentação do corpo dos mamíferos, ele está constantemente passando por um processo de remodelação em resposta às forças e

tensões aplicadas. Essa contínua regeneração do osso desempenha um papel fundamental na reparação de danos causados pela fadiga e na prevenção do envelhecimento excessivo. Além de suas funções estruturais, como a proteção dos órgãos internos e o suporte para os músculos, o osso desempenha um papel essencial na regulação rígida da concentração de íons de cálcio, por meio da reabsorção constante e da formação de novos minerais (36).

Os tecidos mineralizados apresentam estruturas notáveis em diferentes níveis hierárquicos, onde as fases orgânicas desempenham um papel crucial na sua organização estrutural. Como resultado, suas matrizes frequentemente exibem uma composição híbrida, variando na proporção relativa de substâncias orgânicas e inorgânicas. Compreender a complexa interação entre os componentes orgânicos e inorgânicos nas matrizes mineralizadas e sua relação com as propriedades é de grande importância no campo da engenharia de materiais (37).

Apesar de compartilharem a mesma composição mineral, que é a hidroxiapatita, o osso e o esmalte dentário apresentam diferenças significativas em termos de morfologia e conteúdo orgânico. O esmalte dentário é quase inteiramente composto por materiais inorgânicos, enquanto o osso possui um teor orgânico consideravelmente maior. O entendimento dessa composição é essencial para o desenvolvimento de novos materiais híbridos e estruturas à base de apatita, que têm potencial aplicação na regeneração de tecidos ósseos e dentários em seres humanos. Esse conhecimento é fundamental para avanços na síntese química e na engenharia de materiais biomiméticos com aplicações clínicas promissoras (37).

### 2.2.1 Hidroxiapatita

O termo "apatita" é utilizado para descrever uma estrutura mineral com a fórmula química geral  $A_4B_6(MO_4)_6X_2$ , na qual A e B representam íons de cálcio,  $MO_4$  é um grupo fosfato e X é um íon hidróxido (38).

A hidroxiapatita (HAp), representada pela fórmula química  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , é uma variedade cristalina do fosfato de cálcio (CaP). Ela desempenha um papel fundamental como componente mineral predominante em tecidos duros, como osso, dentina dentária e esmalte. Nessas estruturas biológicas, a HAp contribui para a formação de uma hierarquia altamente organizada, interagindo com diversas proteínas e apresentando propriedades morfológicas, estruturais e mecânicas únicas (39). Essa combinação de características faz da HAp um material de grande importância na área da engenharia biomédica e biomateriais, com aplicações promissoras em uma variedade de contextos clínicos e de pesquisa.

## 2.2.2 Componentes Moleculares do Osso

O osso é uma estrutura complexa composta por diversas biomacromoléculas. A matriz óssea é formada por macromoléculas estruturais, como o colágeno, que geralmente são hidrofóbicas. Essas macromoléculas podem ser reticuladas para fornecer suporte e localizar proteínas solúveis em água, que desempenham um papel crucial na nucleação e no crescimento mineral, orientando a organização e o transporte de íons. Embora o colágeno seja o componente orgânico mais abundante no osso, as verdadeiras nucleadoras da componente mineral são outras proteínas associadas à matriz do colágeno. Portanto, as proteínas não colágenas (NPCs), que constituem cerca de 10% do conteúdo total de proteínas na matriz óssea, desempenham uma função essencial na biomineralização (40).

A sialoproteína óssea (BSP ou BSP-II) demonstra uma afinidade significativa por íons de cálcio e é uma fosfoproteína que contém extensas sequências de poli(ácidos glutâmicos). Além disso, possui a sequência RGD de ligação à integrina em seu terminal carboxila (41). Sua expressão geralmente é restrita aos estágios posteriores da diferenciação dos osteoblastos e aos estágios iniciais da mineralização. No entanto, também pode ser encontrada em níveis mais baixos nos osteoclastos (42).

Outra proteína relevante é a osteonectina (ON), uma glicoproteína que desempenha um papel fundamental na ligação do cálcio aos ossos. Ela é secretada por osteoblastos, fibroblastos, células epiteliais e hepatócitos durante o processo de formação óssea, iniciando a mineralização e promovendo a formação de cristais minerais. A osteonectina é encontrada em quantidades significativas em ossos imaturos. Também conhecida como “proteína secretada, ácida e rica em cisteína” (SPARC ou PSPARC), ela possui uma leve fosforilação e apresenta múltiplos resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico repetidos em sua estrutura. Essa glicoproteína é capaz de regular tanto positivamente a nucleação quanto, de forma inibitória, a mineralização de hidroxiapatita (HAp) (37).

Outra proteína de interesse é a osteopontina (OP ou BSP-I), que também é uma glicoproteína. A osteopontina possui uma série de resíduos de ácido poliaspártico e uma sequência RGD próxima ao meio de sua sequência primária. Ela desempenha um papel crucial como reguladora da atividade dos osteoclastos, e o grau de fosforilação da OP é determinante na regulação da nucleação ou inibição da hidroxiapatita (HAp) (43).

Já a osteocalcina (OC) é a proteína não colágena mais abundante presente no osso, sendo sintetizada exclusivamente pelos osteoblastos. Por esse motivo, é considerada um marcador eficaz da diferenciação dessas células (44). A osteocalcina possui a capacidade de inibir a formação óssea, mas não exerce influência sobre o processo de mineralização (45).

### 2.2.3 Componentes Celulares do Osso

As células mais relevantes no processo de mineralização óssea são os osteoblastos e os osteoclastos (Figura 3). Os osteoblastos têm origem em células-tronco mesenquimais que se diferenciam em preosteoblastos, e sua diferenciação final em osteoblastos requer uma complexa regulação celular e molecular, envolvendo a transcrição de fatores como Runx2 e Osterix. Por outro lado, os osteoclastos originam-se de células hematopoiéticas da linhagem de monócitos/macrófagos da medula óssea, que se diferenciam em células gigantes multinucleadas sob a regulação de fatores como o ligante ativador do receptor do fator nuclear kappaB (RANKL) e o fator estimulador de colônias de macrófagos (cFms) (46).

Os osteoblastos desempenham um papel fundamental na formação do material osteóide, que constitui a porção orgânica do tecido ósseo e é composto por colágeno, proteínas não colágenas e polissacarídeos. Além disso, os osteoblastos estão envolvidos no processo de mineralização, regulando as concentrações locais de cálcio e fosfato para promover a mineralização da apatita. Conforme os osteoblastos ficam incorporados na matriz por eles secretada, eles sofrem uma diferenciação final em osteócitos. Essas células, em forma de estrela, constituem aproximadamente 90 a 95% de todas as células do osso maduro e estão interconectadas entre si e com as células da superfície óssea por meio de prolongamentos dendríticos (36).

Por outro lado, os osteoclastos são células responsáveis pelo processo de "reabsorção óssea" (47). Eles possuem um citoesqueleto de actina que se reorganiza em um anel conhecido como "zona de vedação", enquanto sua membrana celular forma uma "borda ondulada" que entra em contato com o tecido ósseo, facilitando a dissolução do mineral apatita e a hidrólise da matriz orgânica rica em colágeno. O processo de reabsorção óssea desempenha um papel essencial no crescimento, na cicatrização e na remodelação do osso adulto, além de regular a disponibilidade de cálcio no organismo (48).

A interação entre os osteoblastos e os osteoclastos na fase celular do processo de mineralização da matriz osteóide é regulada por diversos fatores, sendo o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappaB (NF-kappaB), conhecido como RANKL, um dos principais atores nesse processo (Figura 4). O RANKL pode existir em uma forma solúvel e se liga ao receptor RANK dos osteoclastos, desencadeando a diferenciação dessas células por meio da translocação do NF-kappaB para o núcleo. A ativação do RANKL também envolve fatores intermediários, como o Fator 6 Associado ao Receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF) (TRAF6). Para regular essa interação, os osteoblastos produzem um receptor de ligação solúvel ao RANKL, chamado osteoprotegerina (OPG), que atua como um receptor "chamariz" para o RANKL, bloqueando sua ação e impedindo a diferenciação excessiva dos osteoclastos (46).

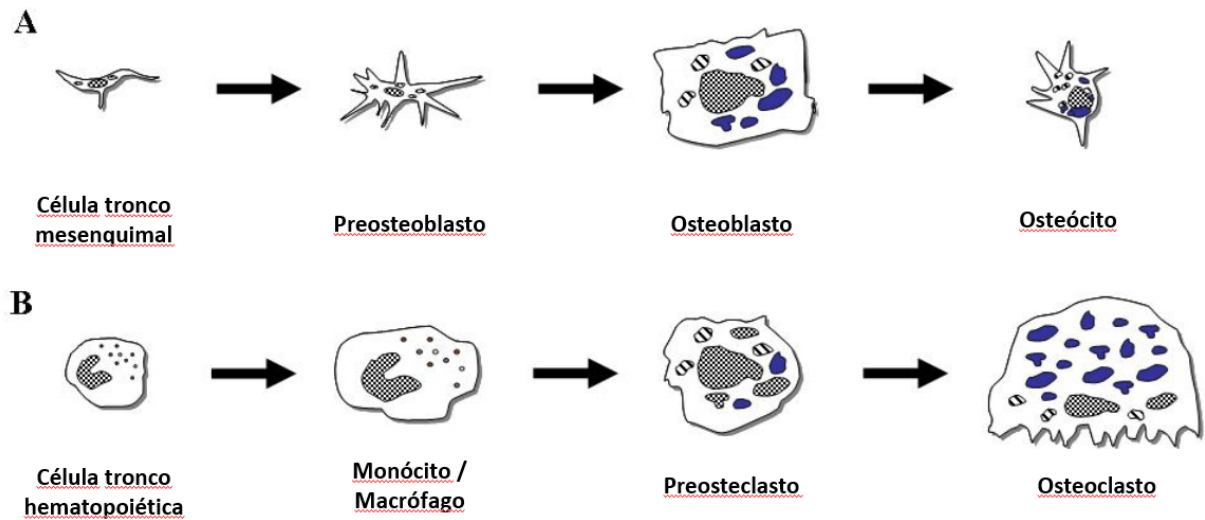


Figura 3 – Diferenciação dos osteoblastos (A) e osteoclastos (B). Adaptado de MARQUIS et al. (2009). (46)

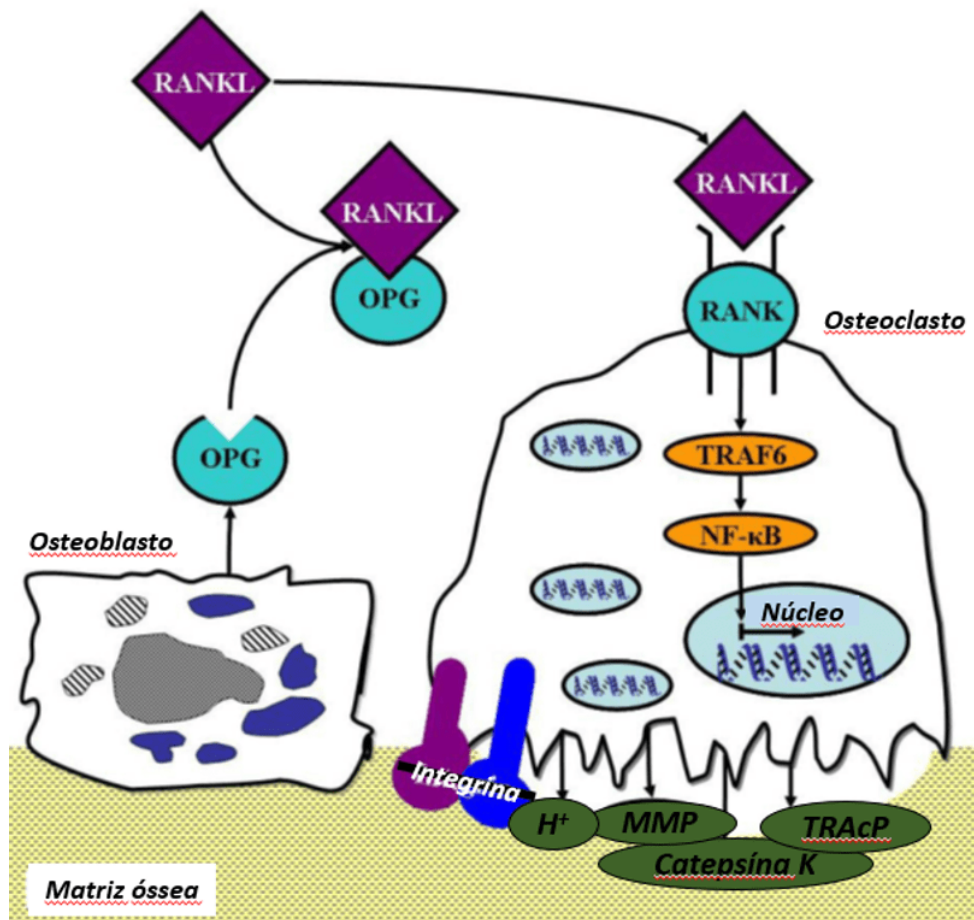


Figura 4 – Interação osteoblastos / osteoclastos. Adaptado de MARQUIS et al. (2009). (46)

## 2.3 Biomineralização

A biomineralização é um processo instigante em que íons inorgânicos são acumulados de forma coordenada juntamente com moléculas de proteínas orgânicas, desempenhando um papel crucial na formação de tecidos ricos em minerais *in vivo* (49, 50). Além de sua importância biológica, o estudo da biomineralização também tem implicações significativas no desenvolvimento de materiais avançados, uma vez que serve como uma fonte de inspiração.

Existem teorias concorrentes que buscam explicar como os materiais inorgânicos são depositados de forma sistemática (Figura 5). As interpretações tradicionais se baseiam em modelos clássicos que descrevem a adição monômero por monômero. No entanto, a cristalização por fixação de partículas (*crystallization by particle attachment*, CPA) é reconhecida como um fenômeno comum, envolvendo desde complexos com múltiplos íons até a formação de nanocristais completamente desenvolvidos. Apesar das evidências experimentais que confirmam a cristalização por fixação de partículas, muitos aspectos fundamentais ainda permanecem desconhecidos, incluindo a influência da estrutura da solução, das forças interfaciais e do movimento das partículas nesse processo complexo (51).

A fixação de partículas é fortemente influenciada pela estrutura do solvente e dos íons nas interfaces sólido-solução, bem como nas regiões confinadas de solução entre superfícies sólidas. A composição da solução e a estrutura do sólido desempenham papéis essenciais na geração das forças que impulsionam o movimento das partículas. À medida que as partículas se deslocam, a estrutura local e as forças correspondentes mudam, levando as partículas de interações de longo alcance para interações de curto alcance e, eventualmente, para eventos de fixação de partículas (51).

## 2.4 Superfícies Metálicas Bioativas

Os estudos de Hench (2006) desempenharam um papel fundamental na definição do conceito de bioatividade. Em uma revisão abrangente que abordou cerca de 40 anos de desenvolvimento de biovidros, ele discutiu seu próprio modelo teórico de 1971. Esse modelo descreveu como um biovidro poderia estabelecer uma ligação química forte com o osso, resultando na formação de uma interface de hidroxiapatita cristalina (13, 52).

A aplicação de revestimentos de biovidro em implantes metálicos teve seu início na década de 1970. Estudos envolvendo próteses de quadril feitas de aço cirúrgico 316L revestidas com biovidro e testadas funcionalmente em animais revelaram uma clara formação de ligação entre o implante e o fêmur. No entanto, a mobilidade limitada do implante e a resistência do substrato na interface foram fatores essenciais para aumentar a



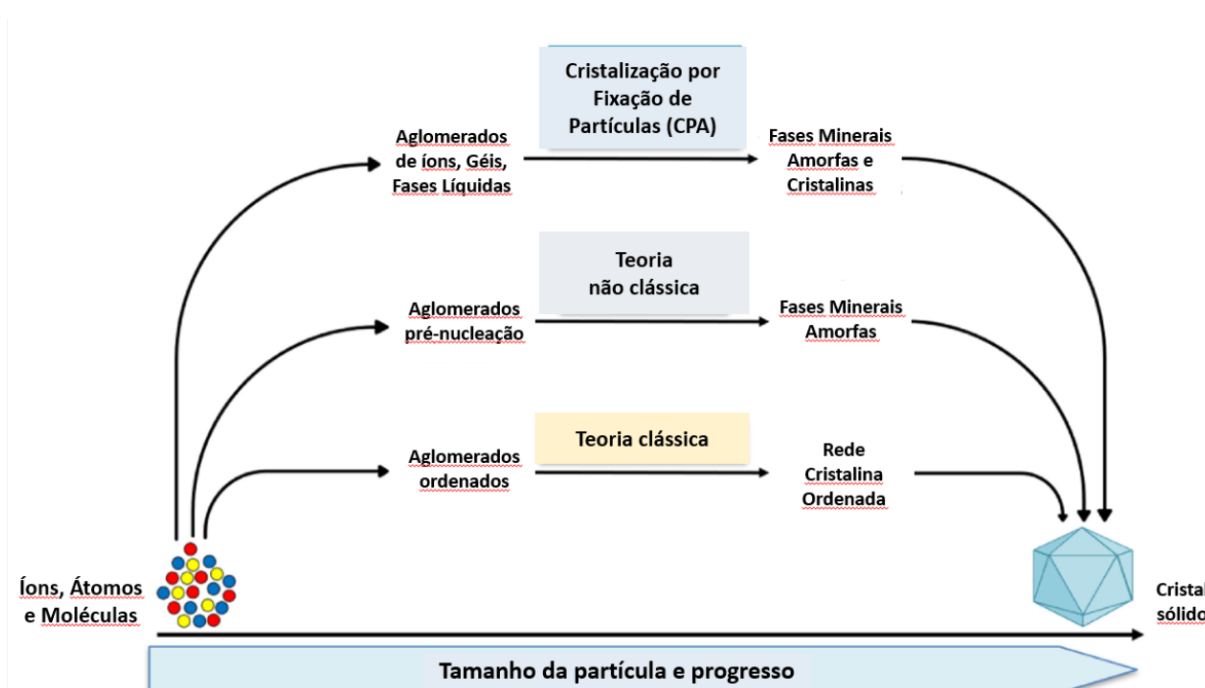


Figura 5 – Processo de mineralização. Teorias gerais que explicam a deposição de biominerais. Adaptado de SHARMA et al. (2021). (50)

taxa de sucesso desses implantes revestidos (53).

Observando as interfaces entre osso e materiais bioativos, KOKUBO (1991) frequentemente identificou camadas de apatita em suas superfícies, indicando sua capacidade potencial de se ligar ao osso. Para reproduzir esse processo *in vitro*, Kokubo desenvolveu um fluido corporal simulado acelular (SBF) com composição iônica e pH semelhantes aos encontrados no plasma sanguíneo humano. Esse SBF simulado foi projetado para induzir a formação de apatita, permitindo testes laboratoriais da capacidade de ligação óssea de materiais (54).

A condição crucial para que materiais, como biovidros e vidros cerâmicos, sejam considerados bioativos é a formação *in vivo* de uma camada de apatita óssea semelhante à do osso em suas superfícies. Isso foi confirmado em cerâmicas, metais e polímeros orgânicos quando esses materiais foram submetidos a um SBF em presença de íons  $CaO$  e  $PO_2$  (54).

A formulação original do SBF não continha íons  $SO_4^{2+}$ , presentes no plasma sanguíneo humano. Posteriormente, foram realizadas modificações em sua composição. No entanto, o SBF revisado ainda difere do plasma sanguíneo humano em relação à concentração de íons  $Cl^-$  e  $HCO_3^-$  (55, 56).

Após uma avaliação rigorosa de sua estabilidade e capacidade de induzir a formação de apatita em materiais sintéticos, o SBF revisado com uma fórmula refinada, que facilita sua preparação, foi registrado em 2007 pelo Comitê Técnico da Organização Internacional

de Padronização (ISO) como a solução padrão para a avaliação *in vitro* da capacidade de formação de apatita em materiais de implantes (57).

Embora algumas cerâmicas, como biovidros, hidroxiapatita sinterizada e vitrocerâmica AW, se liguem espontaneamente ao osso vivo e sejam clinicamente utilizadas como substitutos ósseos, elas apresentam uma tenacidade à fratura menor e um módulo de elasticidade maior em comparação com o osso cortical humano (14).

Os mecanismos subjacentes à reação bioativa *in vivo* envolvem o controle genético do ciclo celular dos osteoblastos (Figura 6). A proliferação e diferenciação dessas células são essenciais para a formação do novo osso. Para entrar nas fases ativas do ciclo celular, que começam após a conclusão da mitose anterior, as células osteoprogenitoras precisam receber os estímulos químicos adequados de seu ambiente local. Caso contrário, elas podem entrar em apoptose, um processo de morte celular programada (13).

O papel dos materiais bioativos está principalmente em liberar íons biologicamente ativos em concentrações críticas e na taxa necessária para estimular a proliferação e diferenciação celular. Se as condições químicas locais não favorecerem a progressão do ciclo celular das células osteoprogenitoras, essas células podem seguir o caminho da apoptose (13).

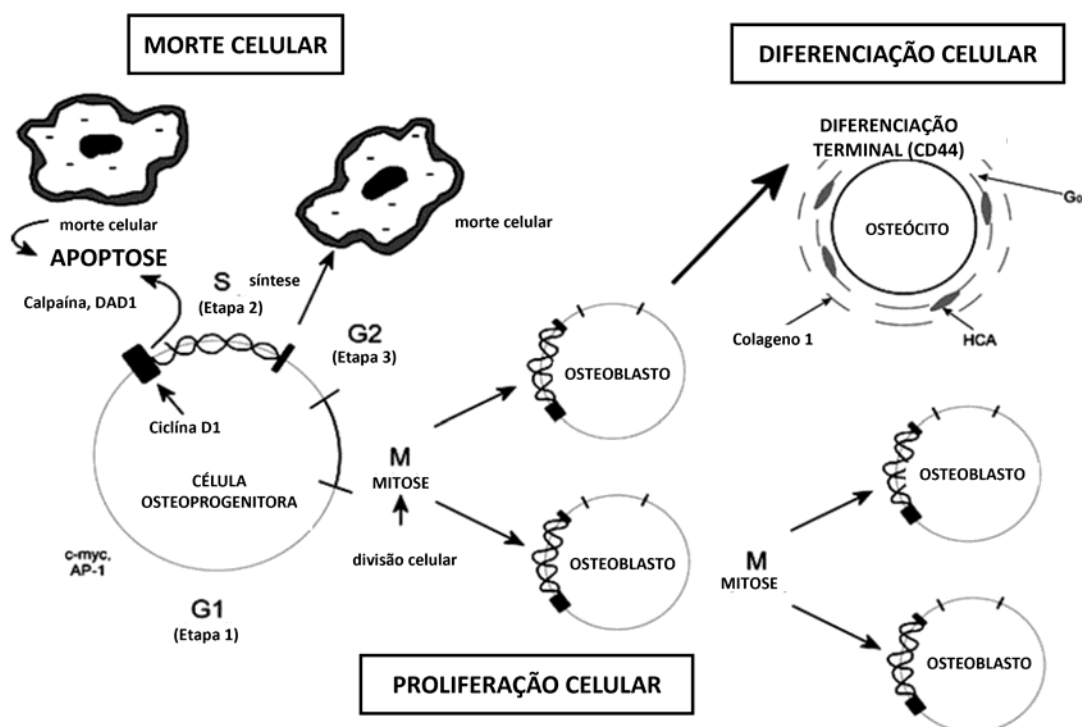


Figura 6 – Ciclo celular do osteoblasto instruído por produtos bioativos de dissolução iônica liberados por biovidro. Adaptado de HENCH (2006). (13)

Os biomateriais evoluíram por diferentes estágios ao longo do tempo, que podem ser

categorizados em três gerações distintas (Figura 7). Os biomateriais de primeira geração são frequentemente denominados bioinertes, caracterizados pela ausência de reatividade com o tecido hospedeiro na interface entre o material e o corpo. Os biomateriais de segunda geração são conhecidos como materiais bioativos, pois têm a capacidade de estabelecer ligações interfaciais com o tecido. Por fim, os biomateriais de terceira geração estão sendo desenvolvidos para estimular respostas celulares específicas em nível molecular, utilizando moléculas bioativas como parte de seu design e funcionalidade. Essa evolução reflete o constante avanço na compreensão e na engenharia de biomateriais, com o objetivo de melhorar sua interação com o corpo humano e promover benefícios terapêuticos mais eficazes (58).

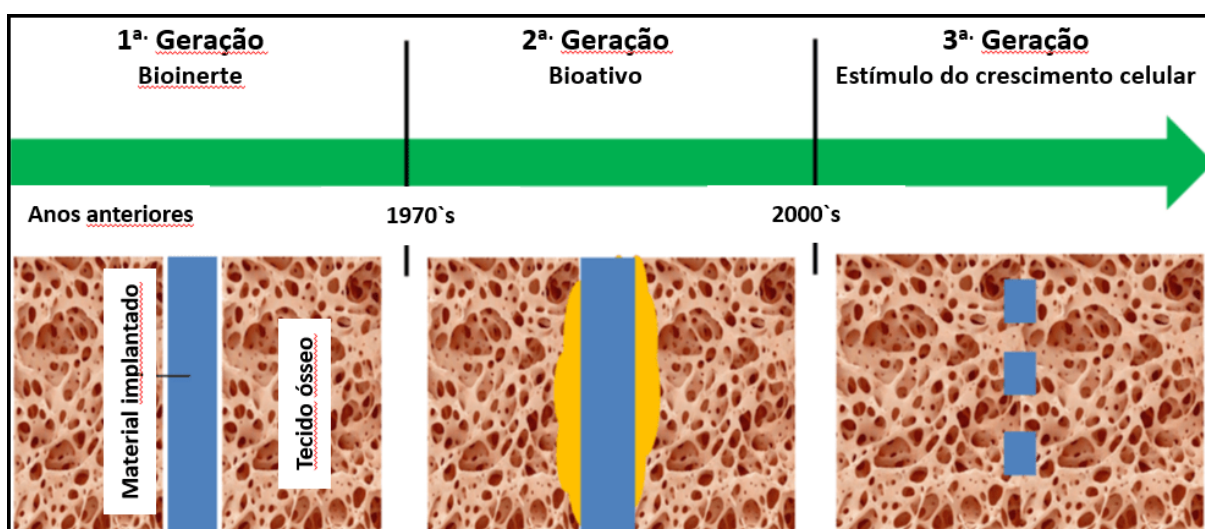


Figura 7 – Gerações dos Biomateriais. Adaptado de FARAG (2023). (58).

A utilização do titânio como um material bioativo de terceira geração representa um avanço significativo na área de biomateriais. Tradicionalmente considerado bioinerte, o titânio pode ser transformado em um material bioativo quando carregado com proteína óssea morfogenética (BMP), como a BMP-2, que induz a formação óssea ectópica. A imobilização dessa proteína na superfície de um implante de titânio permite que ela mantenha sua atividade osteoindutora, estimulando a deposição de osso mesmo quando implantada em regiões ectópicas do corpo (59).

Surpreendentemente, estudos demonstraram que modificações termoquímicas específicas aplicadas ao titânio, um material reconhecido como não bioativo, podem resultar na indução de formação óssea em uma região ectópica, sem a necessidade de células osteogênicas adicionais ou agentes osteoindutores. O tratamento termoquímico alcalino envolve uma série de etapas, incluindo imersão em solução aquosa de NaOH, imersão em água destilada e tratamento térmico subsequente. Esse processo leva à formação de uma camada fina e porosa de titanato de sódio na superfície do titânio. Inicialmente, essa

camada é amorfa, mas com o tempo, ela sofre uma cristalização gradual, adquirindo uma estrutura semelhante à apatita óssea quando submetida à imersão em um fluido corporal simulado (SBF) (12).

O tratamento alcalino faz com que grupos funcionais hidroxila na superfície do titânio assumam uma carga negativa, o que desencadeia a formação de apatita por meio da formação de um composto amorfo. Posteriormente, esse composto amorfo se transforma em apatita mineral óssea (Figura 8). Essa transformação é essencial para promover a bioatividade da superfície do titânio e sua subsequente ligação ao osso, tornando-o um material altamente desejável para aplicações biomédicas, como implantes ortopédicos e odontológicos (14, 60, 61, 62).

A capacidade bioativa de blocos de titânio tratados quimicamente e termicamente foi avaliada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os resultados indicam a capacidade desses blocos de formar apatita *in vitro* e de atuar como osteocondutores *in vivo*, ao contrário de blocos de titânio não tratados submetidos às mesmas condições (12). Esse avanço na bioatividade do titânio representou um marco importante no desenvolvimento de biomateriais e suas aplicações clínicas.

## 2.5 Peptídeos de Ligação à Hidroxiapatita

A regeneração de tecidos mineralizados, como osso e dentina, em casos de defeitos traumáticos ou patológicos, requer uma abordagem biomimética que possa fornecer orientação molecular precisa para a restauração do tecido danificado. A complexidade desses tecidos exige não apenas a indução de respostas celulares específicas para a formação da matriz extracelular, mas também a capacidade de controlar o processo de mineralização de forma temporal e espacial adequada (19).

Proteínas desempenham um papel fundamental na biomineralização, influenciando aspectos como nucleação, cristalografia, polimorfismo e morfologia de minerais biogênicos. Isso levou ao interesse em usar proteínas em processos controlados de mineralização *in vitro*. No entanto, a utilização de proteínas isoladas pode ser limitada devido às dificuldades de extração, purificação e caracterização de suas funções a partir de sistemas biológicos (20).

Uma abordagem eficaz para modular as propriedades de biomateriais é a funcionalização com sequências peptídicas específicas que atuam como elementos de ligação entre células específicas e características químicas do material. Os peptídeos sintéticos de curta extensão (compostos por 9–30 aminoácidos) são particularmente vantajosos nesse contexto, pois podem ser projetados para evitar respostas imunológicas e oferecer maior especificidade em comparação com proteínas de tamanho integral, que geralmente contêm múltiplos domínios funcionais. Além disso, a síntese de peptídeos curtos é mais acessível e

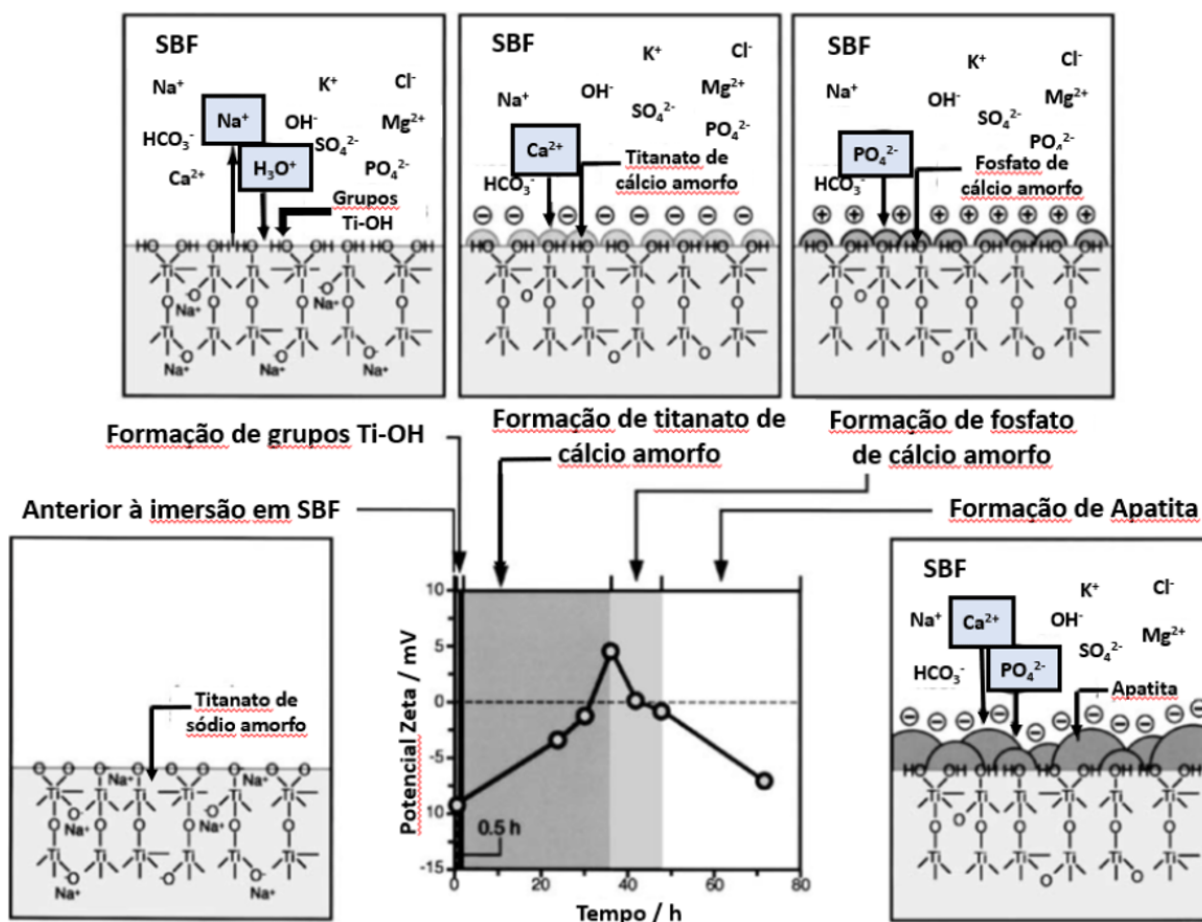


Figura 8 – Relação entre as mudanças na estrutura da superfície e o potencial do titanato de sódio amorfo no processo de formação de apatita em sua superfície em um SBF. Adaptado de KOKUBO et al. (2003). (14)

econômica, com menor probabilidade de induzir mudanças conformacionais, uma vez que não têm tendência tão acentuada a formar estruturas secundárias ou terciárias (63).

Uma abordagem prática e promissora é a utilização de peptídeos selecionados por meio de técnicas como a exibição de fagos, provando ser eficaz na criação de sequências de polipeptídeos que têm afinidade específica com várias superfícies inorgânicas (20).

Nesse contexto, os peptídeos de ligação à hidroxiapatita (HBPs), descobertos por meio da exibição de fagos, surgem como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de biomateriais funcionais destinados à regeneração eficaz de tecidos ósseos e dentários. Eles oferecem uma abordagem promissora para influenciar o desenvolvimento desses tecidos, buscando emular a precisão observada na regulação biológica *in vivo* (19).

O osso é um material compósito natural com uma estrutura hierárquica única, abrangendo escalas que variam desde o nível molecular até o macroscópico. Seu componente mineral consiste em apatita com uma estequiometria altamente substituída, geralmente idealizada como hidroxiapatita ( $\text{HAp}$ ,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Os cristais de apatita em

forma de placa desempenham diversos papéis essenciais, contribuindo para as notáveis propriedades mecânicas do osso e mantendo a homeostase como um reservatório de íons  $Ca^{2+}$  (17).

Portanto, a compreensão dos mecanismos de nucleação e crescimento da HAp é fundamental, pois pode beneficiar o desenvolvimento de tratamentos para condições de mineralização patológica em várias doenças ósseas, bem como impulsionar o avanço de biomateriais na engenharia de tecidos ósseos e dentários (17).

A mineralização da matriz extracelular (MEC) por meio da cristalização da Hidroxiapatita (HAp) é uma etapa crítica no processo de formação óssea normal. A MEC, composta por colágeno insolúvel e proteínas não colágenas solúveis (NCPs), desempenha um papel vital interagindo com íons inorgânicos ou outros polimorfos de fosfato de cálcio (CaP), regulando assim a nucleação e o desenvolvimento da fase final de HAp. A introdução *in vivo* de peptídeos com alta afinidade pela HAp oferece um potencial significativo para direcionar a cristalização dessa substância de maneira biomimética, abrindo perspectivas promissoras para aprimorar ainda mais a regeneração do tecido ósseo (17).

Os peptídeos de ligação à hidroxiapatita desempenham papéis importantes em diferentes estágios da cristalização do  $Ca - PO_4$ , desde a formação de aglomerados amorfo até a transição da fase amorfa para a fase cristalina e, finalmente, o crescimento cristalino. Os resultados indicam que a magnitude da carga líquida dos peptídeos controla suas afinidades de ligação, que, por sua vez, apresentam uma correlação positiva com sua eficácia em direcionar a nucleação e o crescimento da HAp (17).

Em estudos anteriores, foram identificadas sequências peptídicas que demonstram alta afinidade tanto pelo mineral semelhante ao osso (BLM - *bone - like mineral*) quanto pela Hidroxiapatita (HAp) por meio da aplicação combinada de técnicas como exibição de fagos, ELISA e modelagem computacional. Notavelmente, algumas sequências peptídicas específicas de 12 mers, como APWHLSSQYSRT, STLPIPHEFSRE e VTKHLNQISQSY, foram identificadas por sua ligação preferencial à apatita. Como resultado, essas sequências passaram a ser objeto de pesquisas mais aprofundadas no campo da engenharia de tecidos ósseos, com o objetivo de explorar seu potencial aplicativo nessa área (64, 65).

Em um estudo realizado por ADDSON et al. (2010), o objetivo principal foi aprimorar a especificidade de um dos peptídeos previamente identificados devido à sua afinidade pela apatita, tornando-o capaz de se ligar a diferentes materiais. Além disso, buscaram compreender os fatores críticos que influenciam a afinidade desse peptídeo pelo mineral, considerando aspectos como carga líquida, distribuição de carga, sequência e composição de aminoácidos. Para atingir esses objetivos, conduziram investigações que avaliaram os efeitos da fosforilação e variação na sequência do peptídeo em sua adsorção a quatro tipos diferentes de apatitas, incluindo uma semelhante ao osso (BLM) e três variantes de apatitas com níveis variados de carbonato (0%, 5%, 6% e 10,5%). (19) .

Os resultados revelaram que a fosforilação do peptídeo VTKHLNQISQSY (peptídeo VTK) resultou em um aumento de 10 vezes na aderência do peptídeo à apatita semelhante ao osso e um aumento de 2 vezes na aderência à apatita carbonatada. No entanto, essa modificação não teve um efeito significativo na afinidade do peptídeo pela hidroxiapatita pura (sem carbonato). Ao manipular a sequência do peptídeo VTK não fosforilado, observou-se um aumento na especificidade do peptídeo em relação à apatita semelhante ao osso. Porém, o peptídeo VTK fosforilado (pVTK) com sequência alterada não apresentou mudanças significativas em sua ligação ao mineral. Esses resultados indicaram que, embora a sequência e a distribuição de carga fossem importantes para a ligação mineral, a fosforilação foi mais eficaz na melhoria da aderência em comparação com as modificações sequenciais. (19).

Além disso, o estudo também mostrou que os peptídeos fosforilados, especialmente o pVTK, eram capazes de inibir a mineralização de osteoblastos MC3T3 após 12 dias de cultivo, quando a mineralização estava no máximo. A inibição da mineralização foi dependente da dose para o pVTK e, em menor grau, para o pVTK com sequência alterada, enquanto as formas não fosforiladas e com sequência alterada não tiveram efeitos significativos. Isso indicou que a capacidade de inibir a mineralização dependia tanto da sequência do peptídeo quanto de sua carga. (19).

Os estudos também incluíram modelagem computacional das interações entre peptídeos e minerais, revelando uma melhoria favorável na energia de ligação após a fosforilação, que não foi afetada pela alteração da sequência do peptídeo. Em resumo, a fosforilação de resíduos de serina aumentou a especificidade do peptídeo para a apatita semelhante ao osso, cuja aderência foi principalmente determinada pela composição da sequência e carga líquida, enquanto a sequência do peptídeo influenciou a mineralização em culturas de osteoblastos. Essa capacidade de inibir a mineralização pode ter implicações promissoras no tratamento de calcificações patológicas (19).

Em um estudo subsequente, RAMASWAMY et al. (2015) confirmaram esses resultados, demonstrando que o pVTK causou uma inibição dose-dependente da mineralização em células pré-osteoblásticas MC3T3, sem causar efeitos citotóxicos significativos. Embora tanto o peptídeo VTK quanto o pVTK demonstrassem afinidade por minerais sintéticos e secretados por células, a importância relativa da sequência e da carga do peptídeo diferia entre essas duas formas de apatita. A fosforilação e a carga líquida eram mais importantes na ligação do peptídeo ao mineral sintético, enquanto a sequência peptídica e a fosforilação/carga eram igualmente essenciais na inibição da mineralização biológica. Isso sugere que entender como o peptídeo fosforilado interage com minerais e células pode viabilizar sua aplicação no tratamento de processos patológicos de mineralização (21).

A fosforilação de resíduos de tirosina, treonina e serina desempenha um papel fundamental em proteínas associadas à regulação da mineralização óssea, destacando a

relevância desse processo na compreensão das interações entre peptídeos e minerais, bem como em seu potencial terapêutico. (19, 20, 66).

Com base nisso, ZHAO et al. (2016) conduziram um estudo para investigar quatro peptídeos derivados do peptídeo VTK (Tabela 2). O primeiro, denominado VTK <sub>s</sub>, resultou do embaralhamento da sequência primária do VTK. O segundo, VTK <sub>7E</sub>, envolveu a mutação do resíduo de glutamina (*Gln*) do VTK para ácido glutâmico (*Glu*), resultando em um peptídeo com carga líquida neutra. O terceiro, o pVTK, foi obtido pela fosforilação de ambos os resíduos de serina (*pSer*) no VTK, conforme descrito por ADDISON et al. (2010). Esse último peptídeo apresentou uma carga líquida de -3 em pH fisiológico. Dos quatro peptídeos analisados em relação à sua afinidade à hidroxiapatita, o pVTK, resultante da fosforilação dos resíduos de serina no VTK, demonstrou a maior carga líquida absoluta em pH fisiológico, emergindo como o peptídeo com a ligação mais forte à HAp, conforme indicado pela simulação realizada. Em termos de estrutura (Figura 9), observou-se que tanto o VTK quanto o VTK <sub>7E</sub> apresentaram predominantemente uma estrutura helicoidal. Em contrapartida, o VTK <sub>s</sub> e o pVTK demonstraram uma estrutura aleatória ("Random coil") (16).

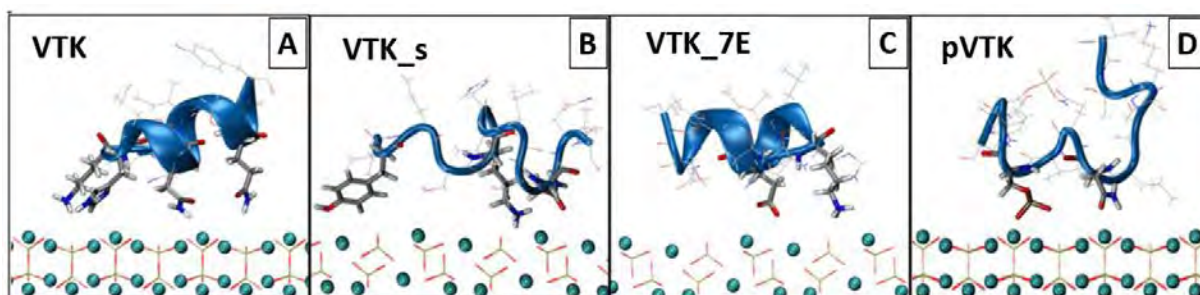


Figura 9 – Estrutura secundária de peptídeos de ligação à hidroxiapatita: (A) VTK, hélice (B) VTK <sub>s</sub>, aleatória (C) VTK <sub>7E</sub>, hélice (D) pVTK, aleatória. Adaptado de ZHAO et al. (2016). (16)

Tabela 2 – Carga líquida (*Net Charge*) de peptídeos de ligação à HAp. Adaptado de ZHAO et al. (2016). (16)

Peptídeo	Sequência	Carga líquida em pH 7	Estrutura secundária
VTK	VTKHLNQISQSY	+1	Helicoidal
VTK <sub>s</sub>	IYQSKHTLSNQV	+1	Aleatória (random coil)
VTK <sub>7E</sub>	VTKHLNEISQSY	0	Helicoidal
pVTK	VTKHLNQISPQSPY	-3	Aleatória (random coil)



A regulação da mineralização do fosfato de cálcio *in vitro* foi observada na presença de Proteínas de Ligação ao Hidroxiapatita com alta afinidade de ligação, o que promoveu um crescimento mais significativo dos cristais de hidroxiapatita (Tabela 3). Essas proteínas, de forte ligação, demonstraram eficácia em retardar a transformação da fase amorfa para a cristalina, resultando em um crescimento preferencial com níveis superiores de cristalinidade quando comparadas às HBPs com menor afinidade de ligação ou a testes conduzidos sem a presença das HBPs (Figura 10) (17).

Tabela 3 – Afinidade de Ligação dos HBPs. Adaptado de LING et al. (2020). (17)

Peptídeos	Carga Líquida	Energia Livre de Ligação (kcal.mol <sup>-1</sup> )
VTK	+1	- 17.9
VTK_s	+1	- 15.3
VTK_7E	0	- 26.1
pVTK	-3	- 34.7

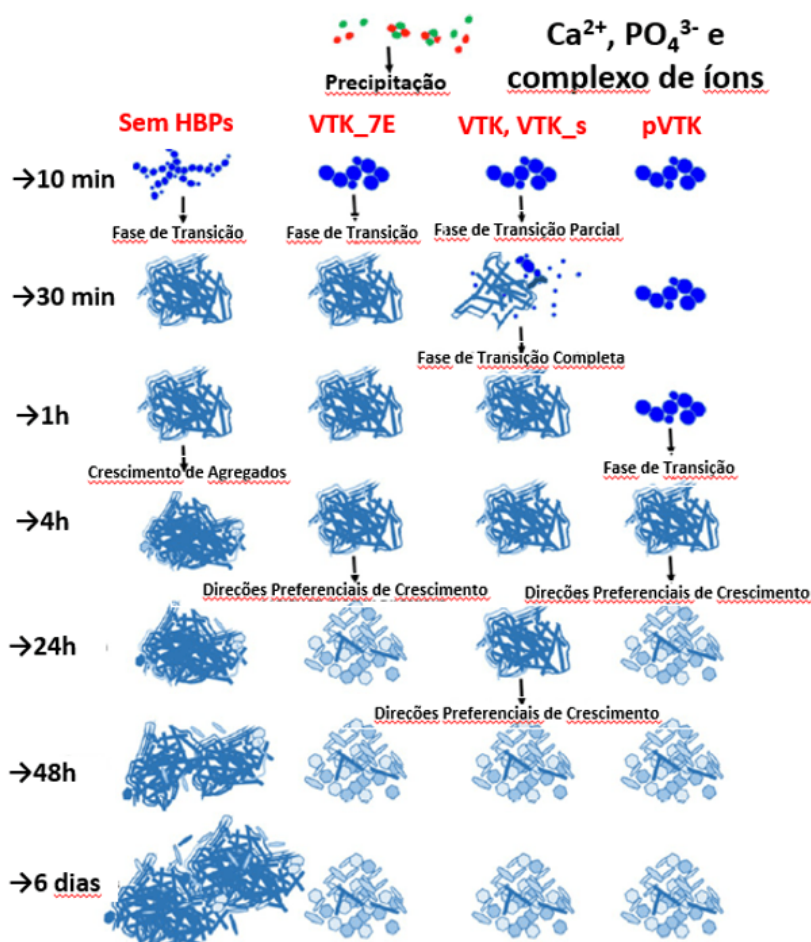


Figura 10 – Precipitação e crescimentos de cristais de HAp x HBPs. Adaptado de LING et al. (2020). (17)

Durante o teste de bioatividade conduzido por DO NASCIMENTO et al. (2023) em amostras de fosfato de cálcio associadas fisicamente ao peptídeo pVTK no meio McCoy, observou-se um incremento significativo na bioatividade. Esse aumento resultou na precipitação de apatita óssea, destacando assim o potencial de mineralização apresentado pelo peptídeo pVTK. Essa descoberta sugeriu uma maior capacidade do peptídeo em influenciar positivamente o processo de formação de apatita em superfícies bioativadas.

A escolha do peptídeo de ligação à hidroxiapatita pVTK para este estudo foi motivada por sua marcante força de adesão em comparação com outros Peptídeos de Ligação ao Hidroxiapatita. Além disso, havia uma lacuna na pesquisa sobre o entendimento de como esse peptídeo poderia regular a etapa inorgânica da mineralização em superfícies metálicas bioativadas.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar e discutir o potencial de mineralização e a viabilidade celular do peptídeo de ligação à hidroxiapatita pVTK imobilizado na superfície do titânio, foram realizados diferentes testes e análises.

A silanização, apesar de ser relativamente demorada e exigir diversas etapas, foi escolhida no presente estudo por ser um método consagrado e muito bem documentado para imobilização de peptídeos na superfície de metais (67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74).

### 3.1 Preparação das Amostras

No presente trabalho foram usados 76 discos de titânio comercialmente puro grau 4 (ASTM F67) com 2mm de espessura, cortados de uma barra de diâmetro 6mm. Após o corte, os discos foram polidos e divididos igualmente em quatro grupos distintos: o grupo de controle negativo, que consistiu em amostras de Titânio sem silanização e sem a presença do peptídeo pVTK (Ti); o grupo de controle positivo, constituído por amostras de Titânio Silanizado, porém sem a presença do peptídeo pVTK (TiSi); e, por fim, os dois grupos experimentais compostos por amostras de Titânio com pVTK, sendo um sem a etapa prévia de silanização (TiP), e o outro com a silanização e a presença do peptídeo pVTK (TiSiP) (Tabela 4).

Tabela 4 – Grupos Estabelecidos para o Teste de Bioatividade

AMOSTRA	REPRESENTAÇÃO	CONDIÇÃO
Titânio Grau 4	Ti	Controle negativo
Titânio Silanizado	TiSi	Controle positivo
Titânio com pVTK (adsorção física)	TiP	Experimental
Titânio silanizado e pVTK (ligação covalente)	TiSiP	Experimental

#### 3.1.1 Uniformização das Superfícies

O processo de uniformização das amostras foi realizado no Departamento de Ciências de Materiais do Instituto Militar de Engenharia, desempenhando um papel importante na replicação da microtextura encontrada em implantes biomédicos comerciais. Essa etapa contribuiu significativamente para simular a textura necessária para a interação efetiva com o tecido ósseo, essencial para a funcionalidade dos implantes. Os discos de titânio foram cortados, polidos e submetidos a tratamento de superfície através de submersão em

uma solução composta por  $H_2SO_4$  /  $HF$  /  $HCl$ . Essa etapa visava criar uma superfície microrrugosa uniforme, com um parâmetro de rugosidade (Ra) entre 1 e 2  $\mu m$ , que é conhecida por promover interações bioativas eficazes entre os implantes e o tecido ósseo circundante. A replicação dessa textura é crucial, uma vez que influencia diretamente a adesão celular, a osteointegração e, conseqüentemente, a viabilidade dos implantes. Vale destacar que as formulações detalhadas dos componentes, bem como o tempo e a temperatura de condicionamento, foram mantidas como informações confidenciais, por tratar-se de procedimento usado no tratamento de implantes comerciais.

Após o condicionamento ácido, os discos foram lavados com água destilada e secos utilizando nitrogênio ( $N_2$ ). A eficácia do condicionamento ácido foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG), enquanto a caracterização da superfície foi realizada por meio do Interferômetro a Laser *Zygo*.

### 3.1.2 Ativação das Amostras

A ativação da superfície das amostras dos grupos TiSiP e TiSi por meio do tratamento alcalino teve como objetivo facilitar a adesão do silano à superfície do titânio. O tratamento alcalino foi conduzido imergindo as amostras em uma solução de  $NaOH$  5M durante 8 horas a  $60^\circ C$ , promovendo a formação dos grupos funcionais hidroxila ( $OH^-$ ). Esses grupos hidroxila são essenciais para facilitar e estabelecer a ligação covalente entre o titânio e o silano, promovendo uma ancoragem robusta e duradoura do revestimento. Após essa etapa, as amostras passaram por um processo de lavagem com água destilada por 30 minutos e posterior secagem individual utilizando nitrogênio ( $N_2$ ) (Figura 11).

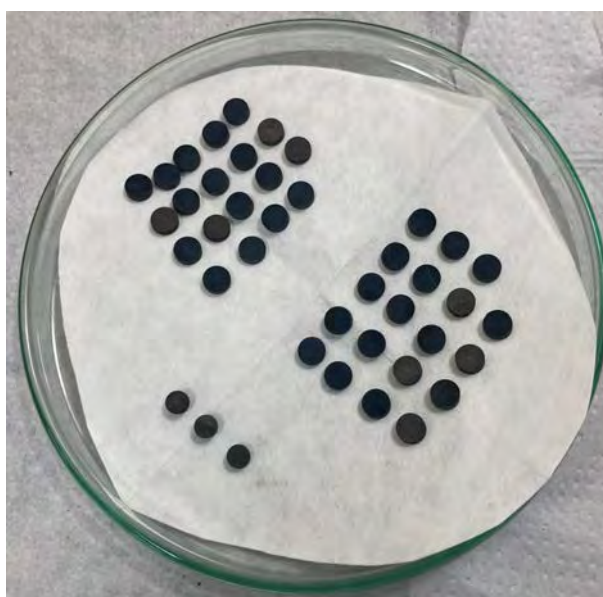


Figura 11 – Amostras dos grupos TiSi e TiSiP ativadas após secagem em  $N_2$

A análise da superfície das amostras ativadas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG) e caracterizada por meio do Interferômetro a Laser Zygo. Essa análise visou identificar possíveis modificações na uniformidade da microtextura superficial e nos parâmetros de rugosidade, comparativamente aos resultados obtidos após o condicionamento ácido. Essa etapa é crucial, pois a verificação dessas alterações pode indicar a eficácia do tratamento alcalino na preparação da superfície para o subsequente processo de silanização, influenciando diretamente a aderência e a estabilidade do revestimento aplicado. Essa metodologia é apoiada e descrita em estudos anteriores, como mencionado por GODOY et al. (2009) e SÁNCHEZ-BODÓN et al. (2021), destacando a relevância desses procedimentos para a funcionalização eficaz de implantes biomédicos (67, 68).

### 3.1.3 Silanização

Para a técnica de silanização, empregou-se o silano 3(cloropropil)-trietoxissilano (CPTES), pentano anidro como solvente e N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) como base, adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil. Esse método é reconhecido por sua eficácia na formação de uma camada orgânica sobre a superfície do titânio, facilitando a ancoragem do peptídeo pVTK.

As amostras ativadas (TiSiP e TiSi) foram imersas em uma solução composta por 7 ml de pentano anidro, 1,2 ml de CPTES e 0,6 ml de DIPEA, sob atmosfera saturada de  $N_2$  por 1 hora, conforme protocolos similares empregados em estudos anteriores (67, 68, 69). Após essa etapa, as amostras foram lavadas meticulosamente três vezes com água destilada e secas por meio de nitrogênio, visando a remoção de excessos e a obtenção de uma camada uniforme e estável de silano na superfície do titânio (Figura 12).

Após a conclusão desse processo, novamente as amostras foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG), enquanto a caracterização da superfície foi realizada por meio do Interferômetro a Laser Zygo para compreensão dos efeitos da silanização sobre as superfícies previamente ativadas.



Figura 12 – Silanização das amostras dos grupos TiSi e TiSiP em atmosfera saturada de  $N_2$

#### 3.1.4 Imobilização do Peptídeo pVTK

A funcionalização das superfícies das amostras silanizadas com o peptídeo de ligação à hidroxiapatita pVTK representa um passo crucial para o estudo da bioatividade dessas superfícies. O procedimento foi realizado visando conferir propriedades específicas aos discos de titânio dos grupos TiSiP e TiP. Para esta funcionalização, uma solução de tampão de fosfato com pH 7,4 (*Phosphate Buffered Saline* - PBS, Sigma-Aldrich Brasil) foi preparada, seguida pela reconstituição do peptídeo pVTK a uma concentração de 0,4 mM, conforme descrito em estudos anteriores (16, 17, 18).

A aplicação controlada do peptídeo foi realizada gotejando suavemente 10  $\mu$ L da solução contendo o peptídeo pVTK 0,4 mM sobre a superfície dos discos de titânio dos grupos TiSiP e TiP, garantindo a cobertura completa da área. Subsequentemente, os discos foram deixados secar naturalmente à temperatura ambiente, permitindo a formação de uma camada uniforme do peptídeo sobre a superfície dos implantes. Esse procedimento visa conferir propriedades específicas às amostras, aprimorando sua interação com o ambiente biológico e promovendo uma maior efetividade das amostras funcionalizadas.

A Figura 13 ilustra de forma esquemática o processo de imobilização do peptídeo pVTK na superfície de titânio utilizando o Método de Silanização. O procedimento começa com a ativação da superfície do titânio para gerar grupos hidroxila com carga negativa, essenciais para a subsequente ligação covalente com o silano. Em seguida, a porção N-terminal do peptídeo pVTK é ancorada à superfície do titânio previamente tratada com CPTES por meio de uma reação de substituição nucleofílica, onde o grupo amina do peptídeo substitui o átomo de cloro do CPTES ligado ao silano, resultando na formação de uma ligação Silano-N estável.

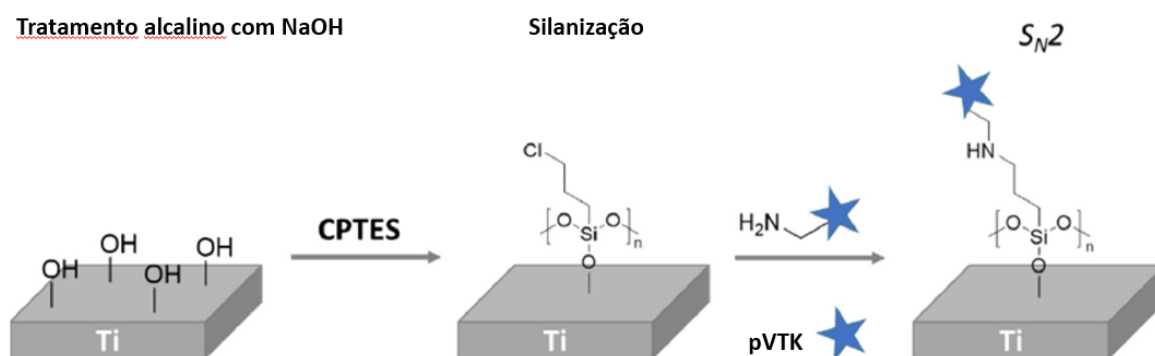


Figura 13 – Representação esquemática da imobilização do pVTK na superfície de titânio através do Método de Silanização. Adaptado de SÁNCHEZ-BODÓN, et al. (2021). (67)

### 3.2 Rugosidade Superficial e Molhabilidade

Para a medição da rugosidade superficial, o parâmetro Ra foi avaliado utilizando um Interferômetro Óptico *Zygo New View 7100*. Essa técnica é reconhecida por sua precisão na obtenção de informações quantitativas sobre a textura da superfície, sendo amplamente aplicada em estudos de biomateriais.

A molhabilidade da superfície foi determinada por meio da medição do ângulo de contato, utilizando um goniômetro *First Ten Angstroms FTA-100* (*First Ten Angstroms Co.*, Portsmouth, VA, EUA). Esta análise foi conduzida empregando uma solução de NaCl 0,9%, permitindo avaliar a capacidade da superfície em interagir com líquidos, o que é crucial para entender a resposta dos materiais quando em contato com fluidos biológicos (75, 76, 77).

### 3.3 Testes *in vitro*

#### 3.3.1 Testes de Bioatividade

Os ensaios de bioatividade e viabilidade celular desempenham um papel essencial na avaliação da eficácia e segurança de biomateriais, especialmente aqueles destinados a implantes biomédicos.

Para a avaliação da bioatividade, foi utilizado o meio McCoy's 5A com HEPES 25 mM, adquirido da Atená Biotecnologia, Campinas, SP. Reconhecido como um substituto eficaz do SBF (*Simulated Body Fluid*), esse meio é conhecido por induzir sinais positivos de bioatividade, tais como a formação espontânea de *bone – like apatite*, o que tem sido amplamente documentado em estudos anteriores para avaliar a capacidade bioativa de materiais (18, 78, 79, 80, 81, 82). Este teste foi conduzido em três amostras de cada grupo, incluindo o grupo controle, permitindo avaliações em intervalos distintos (3, 7 e 14 dias), totalizando 36 amostras. Essa abordagem temporal diversificada proporciona uma compreensão abrangente das interações entre os materiais e o ambiente biológico em diferentes estágios temporais, essencial para avaliar a viabilidade desses materiais para aplicação em implantes biomédicos.

#### 3.3.2 Testes de Viabilidade Celular

Para o ensaio de viabilidade celular pelo método de citotoxicidade indireta, foram utilizadas as células-tronco mesenquimais de polpa dentária (Lonza, PT-5025), cultivadas em frasco de cultura de células de 175 cm<sup>2</sup>, utilizando o meio de cultura *Human Mesenchymal Stem Cell Expansion Medium* (HM) (Millipore - Merck), suplementado com 8% de soro humano (Sigma-Aldrich), 1% de antimicrobianos (penicilina e estreptomicina, Sigma-Aldrich), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1% de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, com substituição do meio de cultura a cada 2-3 dias. As células foram destacadas do recipiente utilizando a enzima TrypLE™ Express (Gibco), quando atingiram aproximadamente 80% de confluência. A seguir, foram imediatamente semeadas a uma densidade de 5 x 10<sup>4</sup> células em uma placa de cultura de 96 poços, obtendo-se o volume final de 100 µL/poço.

Para o teste de viabilidade celular, foram formados quatro grupos experimentais: Ti, TiP, TiSiP e TiSi. Para a produção dos extratos utilizados neste ensaio, os grupos experimentais foram incubados nas mesmas condições das células, ou seja, em meio de cultivo com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, em uma placa de 48 poços. Além disso, o ensaio foi realizado em quintuplicata (n = 5). Após um período de incubação de 24h, 100 µL dos extratos obtidos dos grupos experimentais foram transferidos para a placa de cultura de 96 poços. Para este estudo, foram avaliados dois tempos de exposição: 24h e 48h. Após esses períodos, para a obtenção dos resultados de viabilidade, foram adicionados 10



$\mu\text{L}$  de solução WST-1 (Roche) em cada poço, e as células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$  durante 4h. Após este período, as amostras foram agitadas suavemente durante 1 min, e a absorbância foi medida a 450 nm por um leitor de microplacas (Promega, GloMax E8032).

Como controles para o ensaio de cultura colorimétrico, o meio de cultura contendo WST-1 sem células foi utilizado para definir o limiar de fundo, enquanto o meio de cultura contendo WST-1 com células foi utilizado como controle da viabilidade celular. Os testes de viabilidade celular foram realizados no Departamento de Bioengenharia da R-Crio Células Tronco, em Campinas, São Paulo.

A análise de dados foi realizada com o software *GraphPad Prism* (versão 5.00, GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia). A interação entre parâmetros independentes foi explorada. O significado estatístico foi definido para  $p < 0,05$ .

## 3.4 Caracterização das Superfícies das Amostras

### 3.4.1 Comprovação da União Titânio-silano, Silano-pVTK e Titânio-PVTK

A avaliação da integração entre o silano e a superfície de titânio foi conduzida por meio da Espectrometria por Fluorescência de Raios X (FRX). Esta análise detalhada foi realizada em dois equipamentos: o primeiro, um Espectrômetro por Fluorescência de Raios X Panalytical Epsilon-3; e o segundo, o equipamento Panalytical Axios Max, garantindo, assim, a qualidade, precisão e confiabilidade dos resultados.

Essa abordagem, destaca-se pela sua precisão na detecção e quantificação de elementos químicos nas interfaces, possibilitando uma análise abrangente das uniões formadas. A análise das interações entre Silício-Peptídeo e Titânio-Peptídeo foi conduzida utilizando a mesma técnica de Espectrometria por Fluorescência de Raios X (FRX) nos mencionados laboratórios, o que permitiu a confirmação da presença e integridade do revestimento de peptídeo, bem como sua ligação efetiva à superfície de titânio.

Os procedimentos de análise foram conduzidos em duas etapas. Primeiramente, após a conclusão do processo de silanização nas amostras dos grupos TiSi e TiSiP, foi realizado um exame por FRX para verificar a presença do elemento sício nos grupos mencionados. Em seguida, após a incorporação do peptídeo pVTK nos grupos TiP e TiSiP, as análises por FRX foram repetidas para também aferir semi-quantitativamente nestes grupos, a presença do elemento fósforo oriundo da fosforilação do pVTK.

### 3.4.2 Caracterização Morfológica das Amostras Após o Teste de Bioatividade

A caracterização morfológica das superfícies dos discos de titânio dos quatro grupos estudados foi conduzida por meio de um Microscópio Eletrônico de Varredura com Fonte

de Emissão de Campo (MEV-FEG) Zeiss DSM 940. Esse método permite uma análise detalhada das características topográficas das superfícies dos discos, fornecendo informações sobre a estrutura e a textura desses materiais.

### 3.4.3 Caracterização Química das Amostras Após o Teste de Bioatividade

Adicionalmente, a caracterização química das superfícies das amostras após o ensaio de bioatividade foi realizada por Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS) no mesmo laboratório. Esse procedimento é fundamental para identificar e quantificar os elementos presentes na superfície dos discos após a exposição ao meio McCoy's 5A, fornecendo informações valiosas sobre possíveis alterações químicas ou composicionais decorrentes da interação entre o material e o meio utilizado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Preparação das Amostras

Antes da incorporação do peptídeo, procedeu-se à caracterização das superfícies das amostras por meio de Interferometria a laser, seguida de análises em MEV-FEG. As amostras investigadas englobaram aquelas de titânio submetidas ao tratamento ácido, bem como as amostras após o tratamento alcalino e a subsequente etapa de silanização. O propósito dessa análise consistiu em comparar as superfícies das amostras ao longo das várias etapas que compõem o método de silanização para a incorporação de peptídeos.

As imagens 3D das microtopografias das superfícies após cada etapa de preparação das amostras estão representadas nas Figuras 15, 16A e 16B; enquanto os valores dos parâmetros da rugosidade encontrados após cada etapa são mostrados nas Tabelas 5 a 7, e discutidos a partir dos valores médios encontrados na análise de diferentes regiões de cada amostra (Tabela 8).

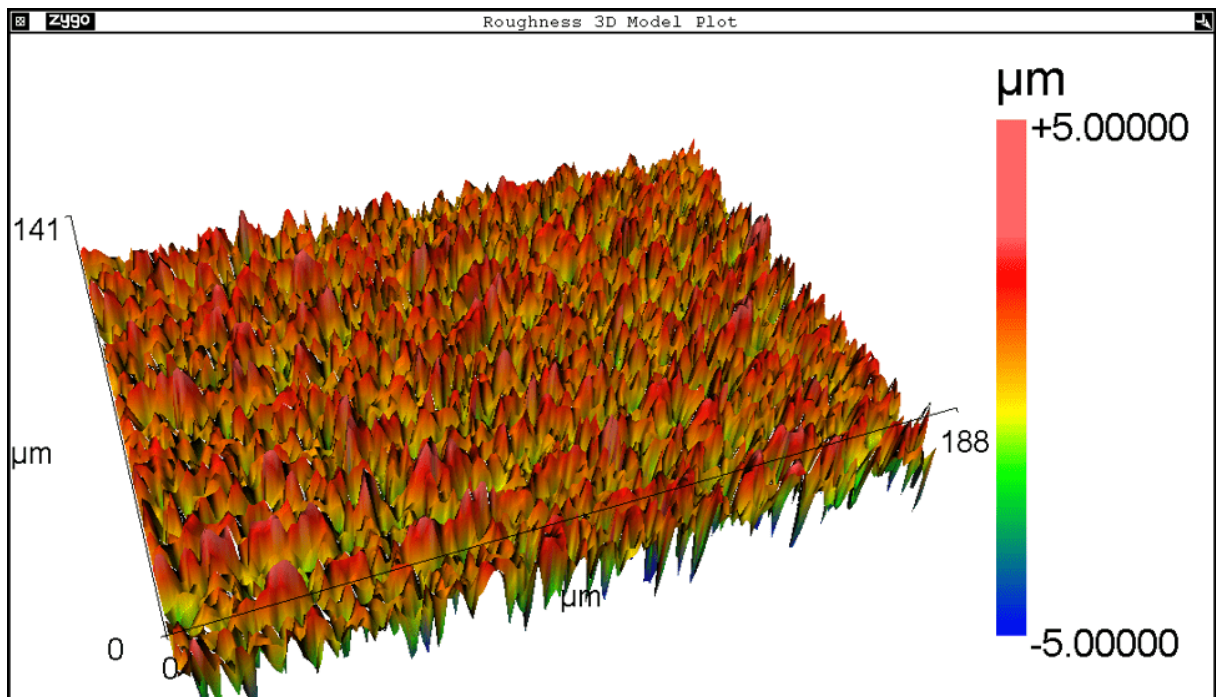
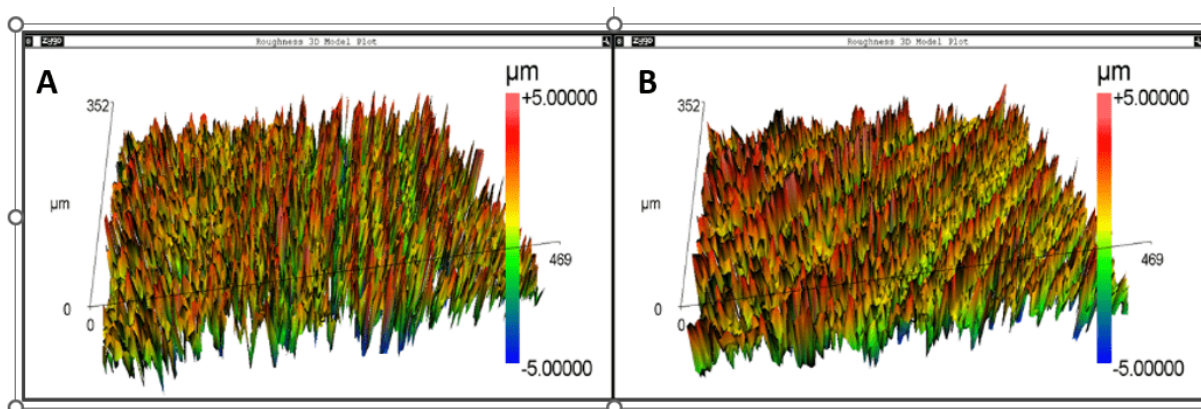


Figura 14 – Imagem 3D da microtopografia da superfície da amostra após condicionamento ácido - Interferômetro *Zygo*

Tabela 5 – Parâmetros de rugosidade em diferentes regiões da superfície da amostra após condicionamento ácido - Interferômetro *Zygo*.

	Ra	Rq	Picos	Vales	Densidade picos	Densidade vales	Distância picos
	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$			$1/\text{mm}^2$	$1/\text{mm}^2$	$\mu\text{m}$
1	1,013	1,380	84	480	3.185,323	18.201,848	17,718
2	0,990	1,303	85	457	3.223,391	17.330,467	17,613
3	1,002	1,313	87	464	3.299,397	17.596,782	17,409
4	1,105	1,453	86	403	3.261,101	15.281,670	17,511
5	1,083	1,424	92	418	3.491,314	15.862,711	16,924
Média	1,038	1,374	87	444	3.292,105	16.854,696	17,435
Desvio	0,052	0,066	3	32	119,188	1.229,869	0,308

Figura 15 – Imagem 3D da microtopografia da superfície da amostra após tratamento alcalino (A) e silanização (B) - Interferômetro *Zygo*Tabela 6 – Parâmetros de rugosidade em diferentes regiões da superfície da amostra após tratamento alcalino - Interferômetro *Zygo*.

	Ra	Rq	Picos	Vales	Densidade picos	Densidade vales	Distância picos
	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$			$1/\text{mm}^2$	$1/\text{mm}^2$	$\mu\text{m}$
1	1,497	1,881	335	653	2.074,292	4.043,321	21,957
2	1,463	1,848	484	922	3.133,691	5.969,552	17,864
3	1,457	1,842	713	1374	4.980,133	9.597,060	14,170
4	1,522	1,895	396	569	2.429,805	3.491,310	20,287
5	1,550	1,927	295	626	1.797,977	3.815,368	23,583
Média	1,498	1,879	445	829	2.883,180	5.383,322	19,572
Desvio	0,039	0,035	166	334	1274,508	2.546,225	3,687

Tabela 7 – Parâmetros de rugosidade em diferentes regiões da superfície da amostra após silanização - Interferômetro *Zygo*.

	Ra	Rq	Picos	Vales	Densidade picos	Densidade vales	Distância picos
	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$			$1/\text{mm}^2$	$1/\text{mm}^2$	$\mu\text{m}$
1	1,231	1,619	621	620	3.769,170	3.763,101	16,288
2	1,157	1,554	676	634	4.101,644	3.846,808	15,614
3	1,365	1,828	667	498	4.053,691	3.026,594	15,706
4	1,255	1,664	765	551	4.641,971	3.343,433	14,677
5	1,213	1,622	617	651	3.743,953	3.950,265	16,343
Média	1,244	1,657	669	591	4.062,086	3.586,040	15,726
Desvio	0,076	0,103	60	64	362,253	388,538	0,673

Tabela 8 – Valores médios dos parâmetros de rugosidade observados em diferentes regiões das superfícies ao longo das três etapas do processo de preparação das amostras. - Interferômetro *Zygo*.

Valores Médios	Ra	Rq	Picos	Vales	Densidade de Picos	Densidade de Vales	Distância de Picos
	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$			$1/\text{mm}^2$	$1/\text{mm}^2$	$\mu\text{m}$
<b>Tratamento ácido</b>	1,038	1,374	87	444	3292,105	16854,696	17,435
<b>Tratamento alcalino</b>	1,498	1,879	445	829	2883,180	5383,322	19,572
<b>Silanização</b>	1,244	1,657	669	591	4062,086	3586,040	15,726

A Tabela 8 resume os valores médios de parâmetros de rugosidade para amostras de titânio após cada etapa de preparação: tratamento ácido, alcalino e silanização. Ao incorporar os desvios padrão obtidos nas Tabelas 5, 6 e 7, uma análise estatística mais completa é alcançada, permitindo melhor avaliar a consistência e a significância das mudanças observadas.

Observou-se que o tratamento alcalino (Etapa 2) aumentou a rugosidade da superfície (Ra e Rq) em relação ao tratamento ácido (Etapa 1), com valores médios passando de 1,038 para 1,498  $\mu\text{m}$  e de 1,374 para 1,879  $\mu\text{m}$ , respectivamente. No entanto, o desvio padrão mais baixo para Ra (0,039  $\mu\text{m}$ ) e Rq (0,035  $\mu\text{m}$ ) após o tratamento alcalino sugere uma homogeneidade maior na rugosidade induzida por essa etapa, em comparação com o tratamento ácido, cujos desvios padrão foram 0,052  $\mu\text{m}$  para Ra e 0,066  $\mu\text{m}$  para Rq.

A transição para a silanização (Etapa 3) resultou em uma diminuição desses valores para Ra e Rq, com desvios padrão de 0,076  $\mu\text{m}$  e 0,103  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Embora essa etapa tenha apresentado a maior variabilidade, indicada pelos desvios padrão, ela também resultou em uma superfície com rugosidade moderada e valores compatíveis com os implantes comerciais.

Em relação aos picos e vales, o tratamento alcalino (Etapa 2) resultou em um aumento no número de picos, com uma média de 445 e desvio padrão de 166, o que sugere uma maior rugosidade e heterogeneidade da superfície. No entanto, após a silanização

(Etapa 3), houve um incremento ainda maior no número médio de picos para 669, embora o desvio padrão tenha diminuído para 60. Este menor desvio padrão indica uma consistência maior na formação dos picos após a silanização, apesar do aumento na média de picos em comparação com o tratamento alcalino.

A densidade de picos seguiu uma tendência semelhante, aumentando da Etapa 1 para a Etapa 3, indicando que a silanização não apenas manteve o número elevado de características superficiais introduzidas pelo tratamento alcalino, como também promoveu uma distribuição mais uniforme dessas características, como sugerido pela redução do desvio padrão. Em contrapartida, a densidade de vales teve um pico após o tratamento ácido e diminuiu posteriormente, sugerindo que as etapas subsequentes podem ter atenuado as depressões mais pronunciadas na superfície.

A distância média entre picos, que aumentou progressivamente, sugere que o tratamento alcalino não somente aumentou o número de picos mas também os distribuiu de maneira mais uniforme, uma tendência que foi revertida pela silanização.

Esses resultados reforçam a interpretação de que o tratamento ácido promoveu vales pronunciados e uma superfície rugosa, o tratamento alcalino aumentou essa rugosidade e a quantidade de picos, enquanto a silanização ajustou a rugosidade para uma superfície mais uniforme.

Em resumo, o tratamento ácido inicial resultou em uma superfície com menor rugosidade e vales mais proeminentes, o que é coerente com a ação corrosiva e mais seletiva do ácido. O tratamento alcalino subsequente aumentou a rugosidade e o número de picos, possivelmente devido à precipitação de hidróxidos ou à formação de uma camada mais porosa na superfície do titânio. Finalmente, a silanização contribuiu para a formação de uma camada mais uniforme e menos rugosa, típica da formação de silanos que podem criar uma superfície mais funcional. A partir destes resultados, pode-se afirmar que as superfícies apresentaram homogeneidade ao término da preparação das amostras.

A abordagem multivariada para análise dos parâmetros de rugosidade confirma que  $R_a$ , isoladamente, não é suficiente para descrever completamente a morfologia da superfície. Os resultados obtidos corroboram a idéia de que a combinação de diferentes parâmetros oferece uma avaliação mais abrangente da topografia da superfície. Os desvios padrão destacam que, embora o  $R_a$  seja um indicador útil e amplamente adotado, é necessário considerar a variabilidade implícita nas superfícies. Superfícies com valores semelhantes de  $R_a$  podem exibir morfologias distintas. Além disso, ainda não existe um consenso definitivo sobre o papel de cada parâmetro na osseointegração. Para obter uma avaliação mais precisa da rugosidade e adesão celular, é recomendável considerar a combinação de diversos parâmetros. No entanto, o  $R_a$  ainda é o parâmetro mais comumente utilizado na literatura como parâmetro para indicação de conformidade com implantes comerciais.

Os resultados confirmam também que as alterações ocorridas na superfície das amostras de titânio durante as etapas do processo de silanização mantiveram os padrões de microrrugosidade recomendados por diversos estudos experimentais sobre a influência da topografia da superfície na resposta óssea e são consistentes para os tratamentos das superfícies dos implantes comerciais. É amplamente aceito que superfícies lisas ( $Ra < 0,5 \mu\text{m}$ ) ou levemente rugosas ( $0,5 < Ra < 1 \mu\text{m}$ ), bem como superfícies excessivamente rugosas ( $Ra > 2 \mu\text{m}$ ), tendem a resultar em respostas ósseas menos favoráveis em comparação com superfícies moderadamente rugosas ( $1 < Ra < 2 \mu\text{m}$ ).

Após o tratamento com ácido, as superfícies das amostras tornaram-se homogêneas, com microcavidades características do ataque ácido. O tratamento com ácido foi eficiente para criar uma superfície microrrugosa uniforme em toda a sua extensão. As morfologias das amostras são mostradas nas Figuras 16 e 17.

Ao comparar as imagens obtidas por MEV-FEG em diferentes áreas da superfície da amostra de titânio após o condicionamento ácido, foi possível verificar a consistência e uniformidade desse tratamento ao longo de toda a superfície da amostra. Esse resultado reforça a confiabilidade e a precisão do processo de criação da superfície microrrugosa, que foi fundamental para os objetivos deste estudo.

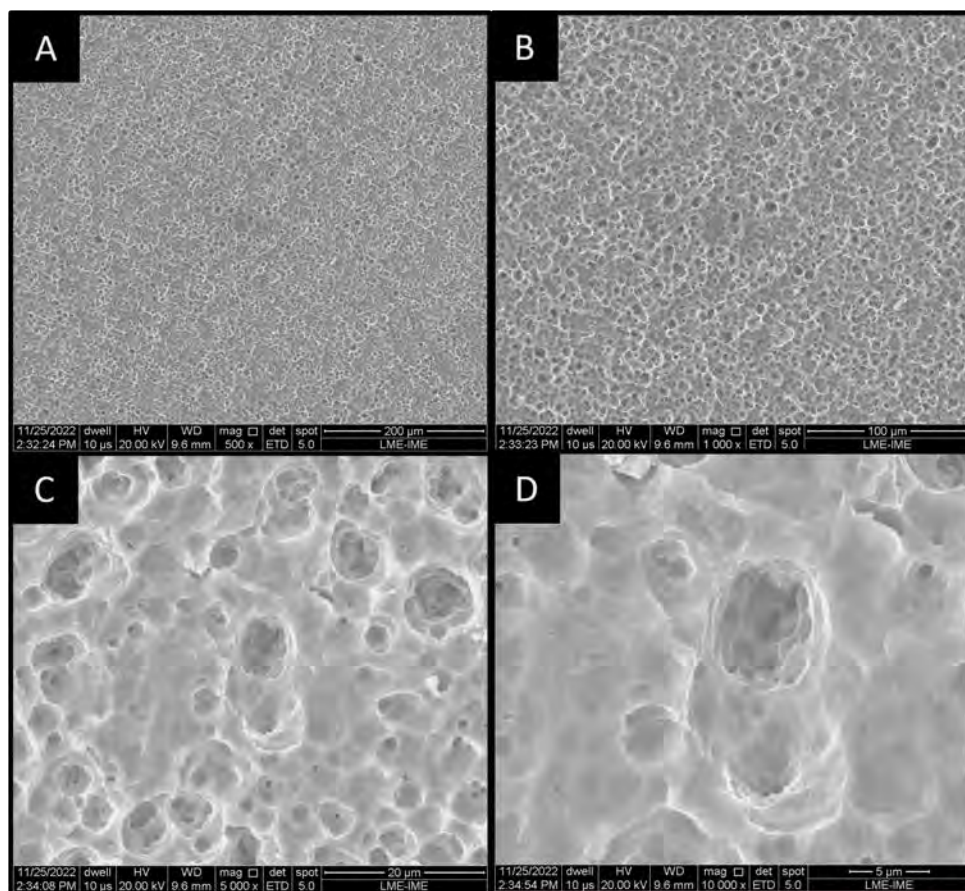


Figura 16 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após condicionamento ácido. Aumento de 500X, 1000X, 5000X e 10000X

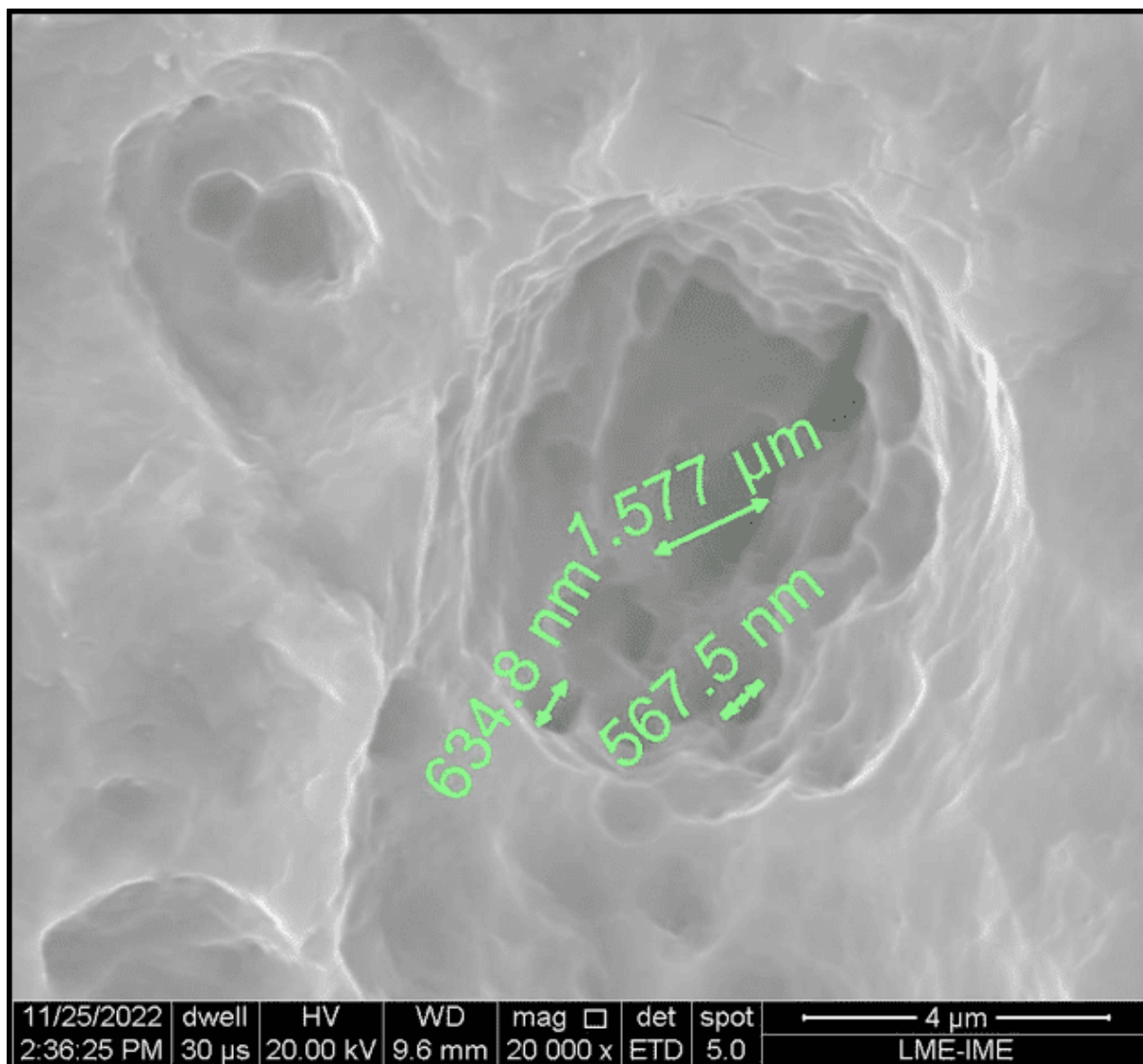


Figura 17 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após condicionamento ácido. Aumento de 20000X

As imagens de microcavidades, que apresentam uma estrutura reticulada com formato e tamanho uniformes, observadas nas amostras após o tratamento alcalino conduzido neste estudo, estão em concordância com os resultados obtidos por LEE et al. (2002), que também identificaram essa característica em suas amostras de ligas de titânio submetidas a tratamentos alcalinos e térmicos (62). No estudo de Lee, as morfologias superficiais das ligas de titânio foram analisadas por meio de técnicas de microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), enquanto, neste estudo, a análise foi realizada exclusivamente por MEV.

A similaridade nas características morfológicas entre as amostras deste estudo e as amostras de LEE et al. (2002) sugere que o tratamento alcalino empregado resulta na formação de um padrão de microcavidades reticuladas. Essas microcavidades podem ser atribuídas à influência do radical  $OH^-$  durante o processo de tratamento alcalino, que



tem o potencial de desencadear corrosão localizada na superfície do titânio. Além disso, estão principalmente relacionadas à contração térmica desigual durante o resfriamento após o tratamento alcalino, provocando as microcavidades nos contornos de grão (Figuras 18A e 18B), uma vez que as diferentes regiões da amostra podem responder de maneira diferente às variações de temperatura, sendo um comportamento comum na formação de óxido em metais.

A comparação com os resultados da etapa anterior, que descrevem a formação de uma superfície microrrugosa uniforme, sugere que o tratamento alcalino pode ter efeitos complexos na superfície das amostras de titânio. Enquanto o processo de condicionamento ácido mencionado anteriormente foi projetado para criar uma textura superficial uniforme e desejada, o tratamento alcalino pode introduzir microcavidades não intencionais.

Portanto, neste estudo, também investigamos os efeitos do tratamento alcalino nas propriedades da superfície das amostras, abrangendo também as alterações na estrutura química e na rugosidade da superfície, considerando ainda a etapa subsequente de silanização e a incorporação do peptídeo pVTK. Essa análise abrangente permitiu uma compreensão mais completa de como essas modificações afetam a bioatividade e outras características das amostras, fornecendo assim informações valiosas para a pesquisa em biomateriais.

Nos aumentos de 5000X e posteriores (Figuras 18C, 18D e 19), foi possível observar a presença de uma camada superficial microporosa após a realização do tratamento alcalino. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por KIM et al. (1997), os quais investigaram as superfícies de metais de titânio submetidos a um tratamento com NaOH e, subsequentemente, a tratamentos térmicos em diferentes temperaturas. No estudo de KIM et al. (1997), foi identificada uma estrutura em forma de rede porosa, que foi interpretada como sendo um gel de titanato de sódio formado na superfície do metal de titânio devido ao tratamento com NaOH. Essa estrutura começou a densificar e a se fortalecer, resultando na eliminação dos poros em temperaturas aproximadas de 600°C (60).

Os resultados do presente estudo e de trabalhos anteriores sugerem a ocorrência da formação de uma camada de hidrogel porosa após o tratamento alcalino. Conforme relatado em estudos prévios, essa camada se torna mais densa e resistente em temperaturas mais elevadas. Esses processos podem influenciar as características da estrutura cristalina da superfície das amostras de titânio. (60, 83).

A formação de um hidrogel de titanato de sódio na superfície do titânio durante o tratamento alcalino é um processo complexo que envolve várias etapas e reações. O processo não é totalmente delineado por uma única equação química, mas pode ser representado de forma simplificada por uma série de reações que descrevem a transformação da superfície do titânio, conforme apresentado pelas equações (Equações 4.1a a 4.1d) a seguir:

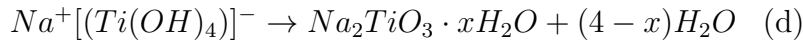
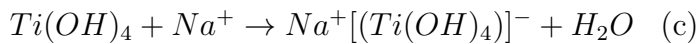
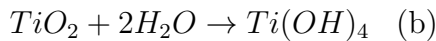
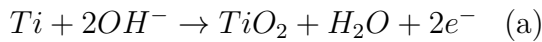
a. Hidrólise e oxidação do titânio: O titânio é oxidado pelos íons hidróxido provenientes do NaOH, formando óxido de titânio ( $TiO_2$ ) e água ( $H_2O$ ).

b. Formação inicial de hidróxido de titânio: O óxido de titânio reage com a água para formar hidróxido de titânio ( $Ti(OH)_4$ ), que é um precursor para a formação do hidrogel.

c. Intercalação de íons sódio e formação de hidrogel: Os íons sódio da solução de NaOH se intercalam no hidróxido de titânio, contribuindo para a formação de uma estrutura de hidrogel que contém íons sódio ligados ao hidróxido de titânio. O produto é um composto de tipo hidrogel, rico em água e com uma estrutura porosa.

d. Evolução do hidrogel para titanato de sódio: Com o tempo e, possivelmente, com o auxílio de um tratamento térmico suave, o hidrogel pode evoluir para uma forma mais consolidada de titanato de sódio hidratado  $Na_2TiO_3 \cdot xH_2O$ , onde x representa o número de moléculas de água ligadas à estrutura do titanato de sódio.

Equações 4.1



A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/FEG) das superfícies das amostras após o processo de silanização não revelou diferenças significativas em comparação com as imagens das superfícies obtidas na etapa anterior. O fenômeno observado anteriormente, caracterizado pelo surgimento de microcavidades nos contornos de grãos e pela formação de uma superfície microporosa, repetiu-se nessa fase do experimento sugerindo que a camada de titanato de sódio, formada anteriormente, foi mantida, mesmo após a imersão das amostras em uma solução contendo CPTES para a incorporação do silano (Figuras 20 e 21). Esses resultados apontam para a resistência da camada de titanato de sódio às condições do processo de silanização, indicando que essa camada pode atuar como uma base sólida para a posterior incorporação do silano.

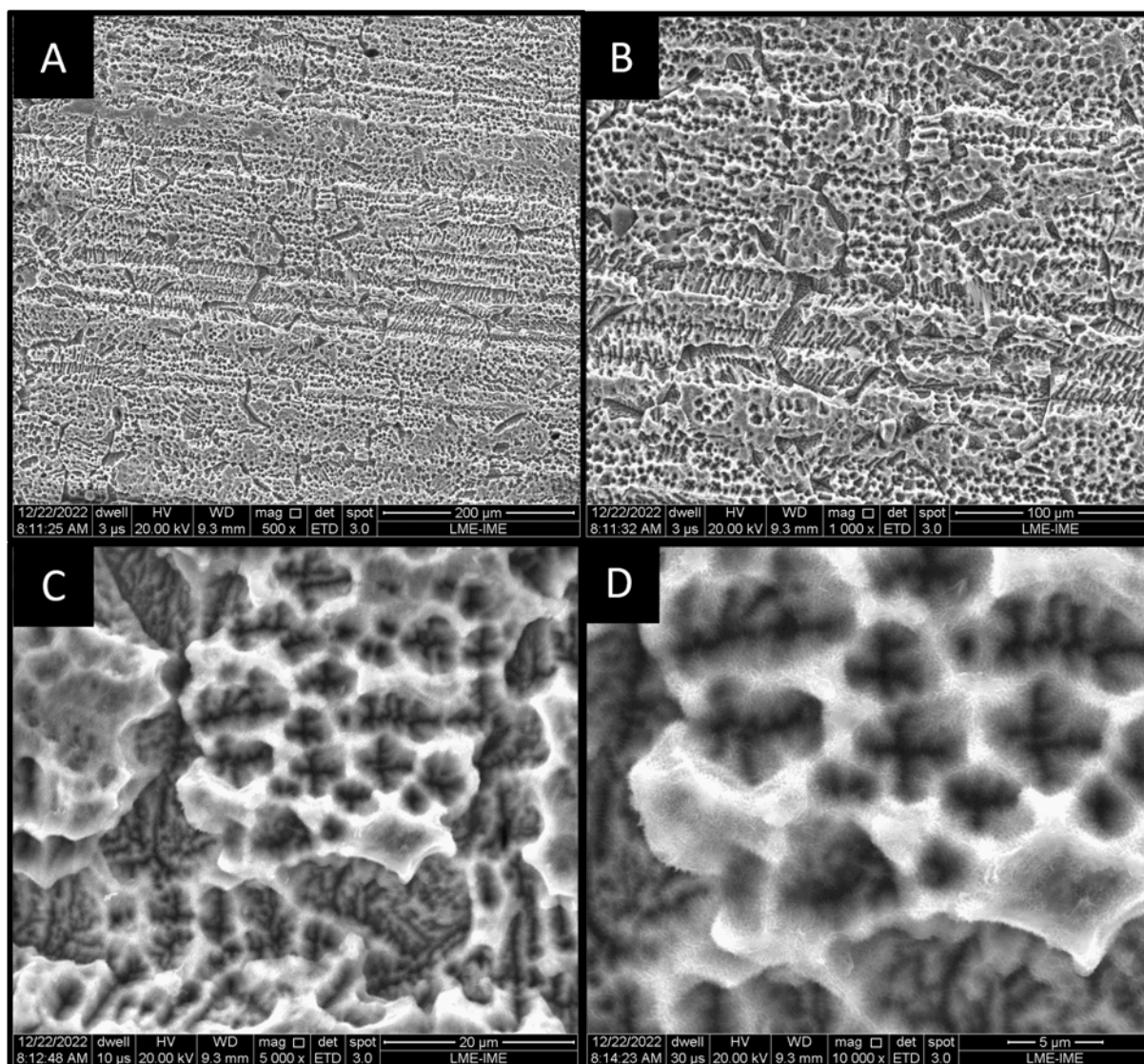


Figura 18 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após tratamento alcalino. Visualização de micocavidades nos contornos de grãos (A) e (B) em aumentos de 500X e 1000X; e de uma camada superficial microporosa (C) e (D) em 5000X e 10000X.

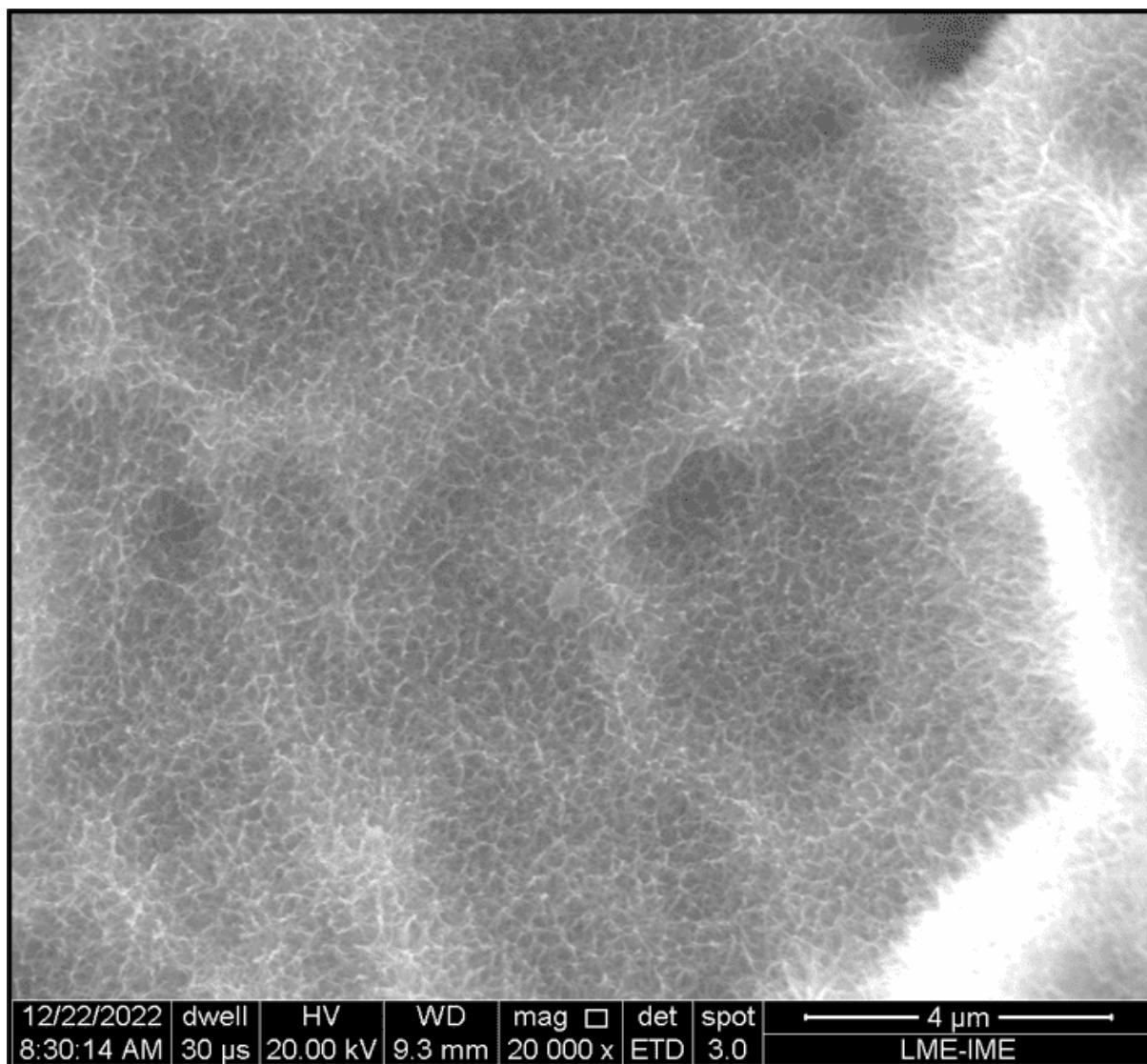


Figura 19 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após tratamento alcalino. Aumento de 20000X.

Após o tratamento alcalino com NaOH, a imersão das superfícies de titânio com uma camada de hidrogel de titanato de sódio (grupo TiSi e TiSiP) em uma solução composta por pentano anidro, (3-cloropropil)trióxissilano (CPTES) e N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), sob atmosfera saturada de nitrogênio (N), ou seja, processo conhecido como silanização, e que pode ser resumido quimicamente da seguinte forma:

a. Preparação da Solução: O pentano anidro foi usado como solvente para dissolver o CPTES e o DIPEA. O pentano foi escolhido por ser não-polar e pode solubilizar eficientemente o CPTES, que também é não-polar.

b. Ativação com CPTES: O CPTES é um silano com um grupo funcional cloropropil que pode reagir com grupos hidroxila na superfície do hidrogel de titanato de sódio. O grupo etoxi do CPTES sofreu hidrólise na presença de água da estrutura do hidrogel

formando grupos silanol, que reagiram com os grupos hidroxila do hidrogel para formar ligações siloxano (-Si-O-Si-).

O resultado deste processo foi a formação de uma camada de silano ligada covalentemente à superfície do titanato de sódio, com grupos cloropropil pendentes que posteriormente foram usados para a funcionalização da superfície com o peptídeo pVTK no grupo TiSiP.

As reações químicas envolvidas são complexas e podem ser representadas de forma simplificada pelas Equações 4.2a e 4.2b:

Equações 4.2:

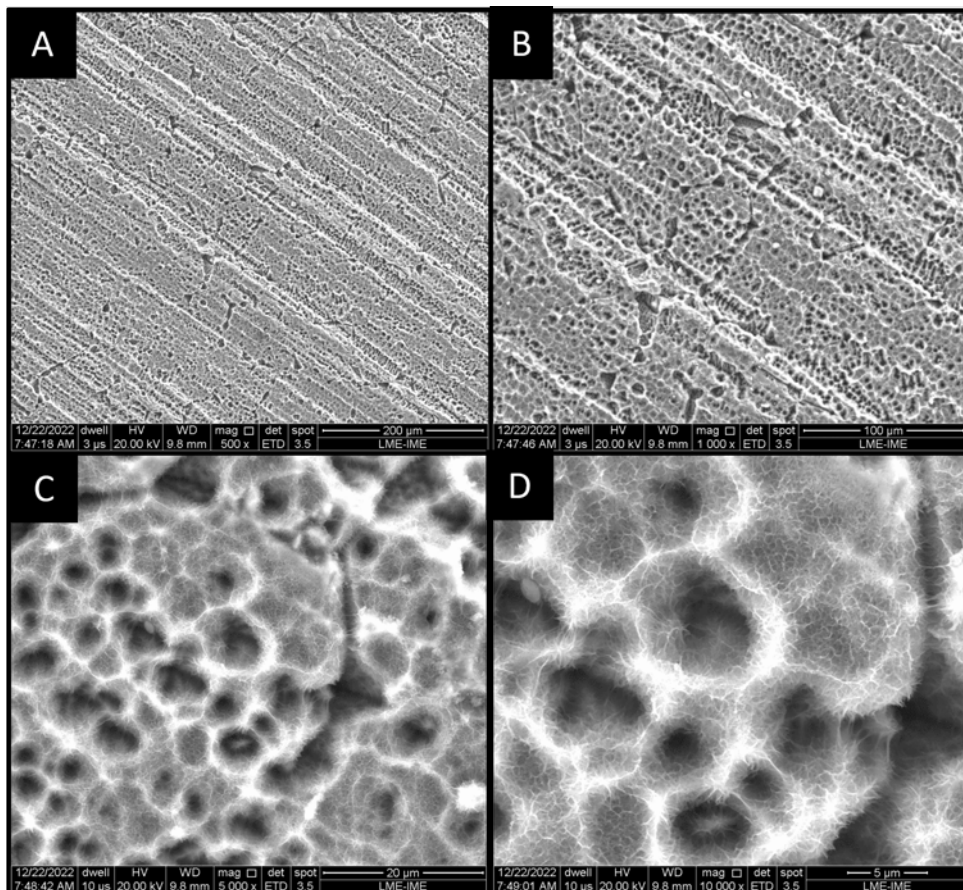
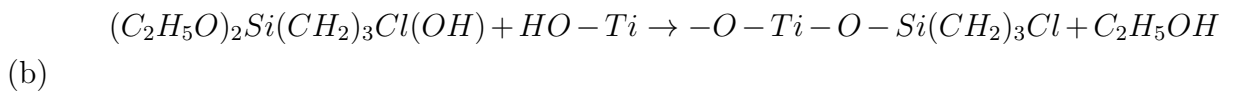


Figura 20 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após silanização. Visualização de microcavidades nos contornos de grãos (A) e (B) em aumentos de 500X e 1000X; e de uma camada superficial microporosa (C) e (D) em 5000X e 10000X.

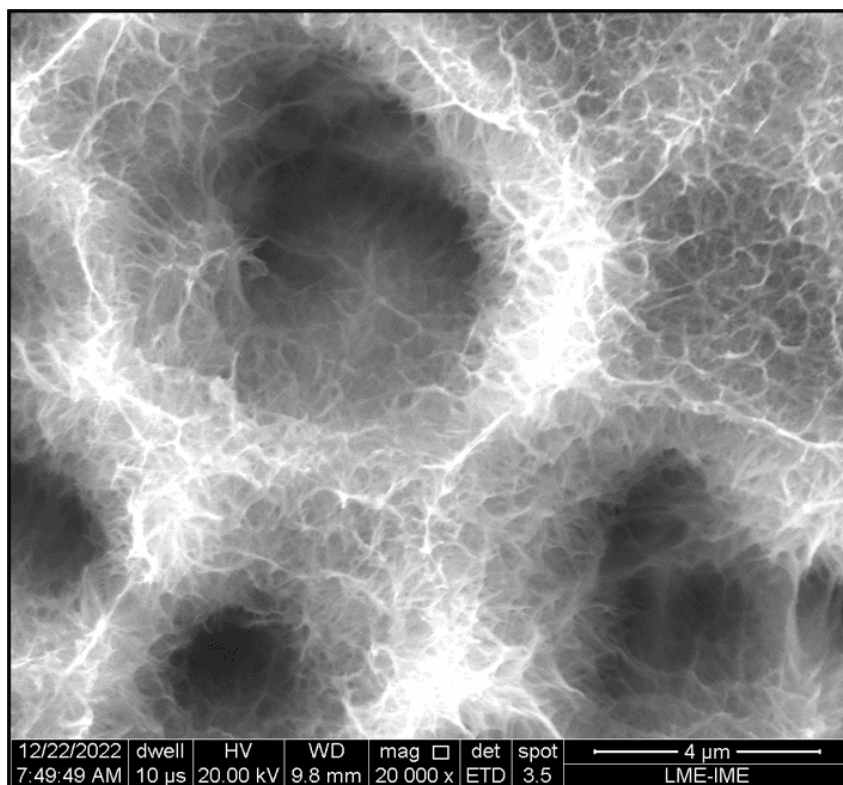


Figura 21 – Micrografia (MEV-FEG) da superfície da amostra de titânio após silanização. Aumento de 20000X.

Para analisar a influência da energia da superfície e molhabilidade antes da incorporação do peptídeo, foi realizada a medida do ângulo de contato das amostras utilizando um Goniômetro FTA100 (First Ten Angstroms, Portsmouth, VA, USA). Os valores dos ângulos de contato nas três etapas de preparo das amostras foram os seguintes:  $70.56^\circ$  após o condicionamento ácido,  $23.39^\circ$  após o tratamento alcalino e  $39.13^\circ$  após a silanização (Figura 22). Os resultados apontam para uma maior hidrofiliabilidade das superfícies após o tratamento alcalino e silanização em comparação com a superfície submetida apenas ao condicionamento ácido.

Comparando a metodologia aplicada e os resultados encontrados neste trabalho com o estudo de TUGULU et al. (2010), ambos investigaram os efeitos do tratamento alcalino na superfície de amostras de titânio. No presente estudo, as amostras foram submetidas a um tratamento alcalino específico, imersas em uma solução de NaOH 5M a uma temperatura de  $60^\circ\text{C}$  por 8 horas, com o objetivo de promover a formação de grupos funcionais hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) na superfície das amostras de titânio. TUGULU et al. (2010) também trataram amostras de titânio com NaOH, porém posteriormente as submeteram a tratamentos térmicos em diversas temperaturas diferentes. Ambos os estudos observaram a formação de uma camada microporosa na superfície das amostras após o tratamento alcalino, o que sugere a formação de um gel de titanato de sódio. No entanto, as diferenças nas condições do tratamento, como concentração de NaOH e temperatura, conduziram a

resultados distintos (84).

O estudo de TUGULU et al. (2010) destacou que a superhidrofilicidade foi alcançada somente após o tratamento com soluções de pH acima do ponto isoelétrico do  $TiO_2$ , que é cerca de  $pH = 4-6$ . Eles também observaram a troca de prótons por íons de sódio nas superfícies de  $TiO_2$ , mesmo em concentrações tão baixas quanto 1 mM de NaOH. Em contraste, o presente estudo empregou um tratamento alcalino com NaOH 5M, resultando na formação de uma camada microporosa, mas sem atingir a superhidrofilicidade (84).

De acordo com DRELICH & CHIBOWSK (2010), nos materiais definidos como superhidrofóbicos, a água forma ângulos de contato iguais ou maiores que  $150^\circ$ . Já os materiais superhidrófilos se referem a materiais texturizados e/ou estruturados com um fator de rugosidade superficial (definido pela equação de Wenzel) maior que um ( $r > 1$ ), onde a água se espalha completamente e apresenta um ângulo de contato aparente quase zero, geralmente inferior a  $5-10^\circ$  nas condições de funcionamento do material. Essas definições conceituais ajudam a contextualizar as observações e diferenças em relação à superhidrofilicidade alcançada no presente estudo e no de TUGULU et al. (2010). Embora ambos os estudos demonstrem a formação de uma camada microporosa, as condições específicas de tratamento determinam se a superhidrofilicidade é alcançada de acordo com as definições de DRELICH & CHIBOWSKI (2010) (84, 85).

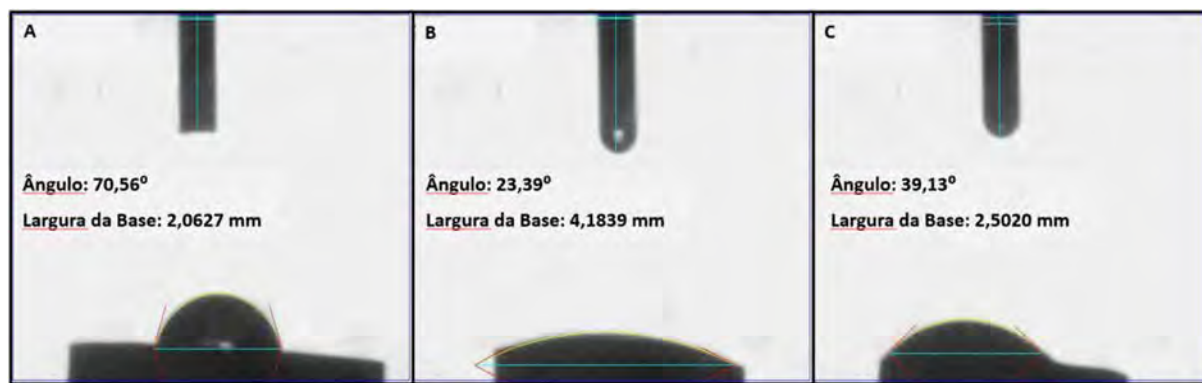


Figura 22 – Imagem das análises de Medida do Ângulo de Contato e Molhabilidade realizadas nas superfícies das amostras nos estágios inicial (A), intermediário (B) e final (C) do processo de silanização.

No contexto do ambiente biológico, as características da superfície de um implante, incluindo sua composição química, topografia e capacidade de reter líquidos, desempenham um papel crucial na regulação da resposta das células e podem influenciar na interação do material com o microambiente. Em um estudo conduzido por HOTCHKISS et al. (2016), que envolveu o cultivo de macrófagos em superfícies de titânio com diferentes níveis de rugosidade e capacidade de molhabilidade, foi observado que materiais com alta molhabilidade superficial criam um microambiente que tende a ser anti-inflamatório.

Isso ocorre através da ativação de macrófagos com características anti-inflamatórias e da produção de interleucinas específicas, o que sugere que essa propriedade pode ser utilizada para aprimorar a resposta na cicatrização óssea (27).

Portanto, fica claro que ao término da preparação das amostras de titânio que foram usadas posteriormente para incorporação do peptídeo pVTK e que formaram os quatro grupos do presente estudo apresentam propriedades superficiais propícias para uma resposta óssea favorável, sendo compatíveis com os implantes dentários e ortopédicos disponíveis no mercado. Isso realça a importância de considerar não apenas a composição química, mas também as características topográficas e de molhabilidade da superfície dos implantes na busca por materiais ideais para aplicações biomédicas.

## 4.2 Ensaios Após a Incorporação do pVTK

Concluída a etapa de preparação e análise das amostras, as superfícies dos discos de titânio dos grupos TiP e TiSiP foram submetidas ao processo de funcionalização. Esse processo envolveu o gotejamento controlado de 10  $\mu\text{L}$  da solução contendo o peptídeo pVTK a uma concentração de 0,4 mM sobre as superfícies dos implantes, garantindo uma cobertura completa da área e possibilitando a formação de uma camada uniforme do peptídeo sobre as superfícies dos implantes.

No presente estudo, foi analisada a funcionalização da superfície de titânio utilizando o peptídeo pVTK, o qual é composto por aminoácidos com grupos funcionais variados. O grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) é o principal reativo para a ligação em superfícies modificadas com (3-cloropropil)trióxissilano (CPTES). Este grupo amina está presente tanto no terminal N-terminal quanto nos resíduos de lisina dos peptídeos.

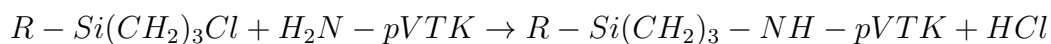
O grupo amina N-terminal do peptídeo pVTK é predominantemente o mais reativo e acessível para as reações de acoplamento. Apesar da presença de um resíduo de lisina, observou-se que a sua amina lateral é menos acessível devido à sua localização interna e às interações estéricas com outros resíduos na cadeia peptídica, o que restringe sua exposição e reatividade.

A amina N-terminal foi identificada como o sítio primário para a ligação à superfície do titânio tratada com CPTES. Esta ligação se concretiza através de uma reação de substituição nucleofílica, na qual o grupo amina ataca e substitui o átomo de cloro do CPTES ligado ao silício, formando uma ligação Si-N robusta e estável. Este mecanismo de ligação eficiente permite a funcionalização da superfície de titânio com o peptídeo pVTK, resultando em uma superfície modificada (TiSiP).



A reação química simplificada envolvida na formação da superfície TiSiP pode ser representada conforme a Equação 4.3:

Equação 4.3:



Onde:

$H_2N - pVTK$  representa o peptídeo pVTK com uma amina N-terminal livre para a reação.

$R - Si(CH_2)_3 - NH - pVTK$  representa o produto final, onde o peptídeo pVTK está covalentemente ligado à superfície de titânio tratada com CPTES através de uma ligação Si-N.

$HCl$  é o cloreto de hidrogênio liberado como subproduto da reação.

Após a conclusão deste procedimento, todas as amostras dos quatro grupos de estudo foram submetidas a uma série de testes, incluindo os Testes de Bioatividade e de Viabilidade Celular, bem como caracterizadas por meio de técnicas analíticas, tais como Espectrometria por Fluorescência de Raios X (FRX), Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS) e Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG). Essa abordagem abrangente permitiu a avaliação detalhada das propriedades e comportamento das amostras funcionalizadas, fornecendo informações valiosas para a compreensão do impacto da funcionalização na bioatividade e viabilidade celular desses implantes.

#### 4.2.1 Espectrometria por Fluorescência de Raios X (FRX)

Na análise de FRX realizada com Espectrômetro por Fluorescência de Raios X Panalytical Epsilon-3 (Tabela 9), as amostras do grupo Ti apresentaram 99.795% de titânio e alguns contaminantes residuais. Em contrapartida, as amostras do grupo TiP revelaram a presença de 1.037% de fósforo (P), o qual é parte integrante do peptídeo pVTK. Conforme já citado anteriormente, esse peptídeo é formado por meio da fosforilação de dois resíduos de serina presentes no peptídeo VTK (16, 17, 19). Adicionalmente, nas amostras desse grupo, observou-se a presença de 3.367% do elementos cloro (Cl) e de resíduo de sódio (Na), que estão relacionados à solução de PBS utilizada na preparação do peptídeo pVTK, com uma concentração de 0,4 mM.

As amostras do grupo TiSi, por sua vez, exibiram a presença de 1.091% do elemento silício (Si) em conjunto com o titânio, confirmando a eficiência do processo de silanização. No grupo TiSiP, além do titânio (95.288%) e do silício (1.222%), detectou-se também

0.216% do elemento fósforo, confirmando assim a presença do peptídeo pVTK na superfície silanizada.

Tabela 9 – Percentual (%) em massa dos componentes da superfície das amostras em Espectrometria por Fluorescência de Raios X – Panalytical Epsilon-3.

	<b>TI (%)</b>	<b>P (%)</b>	<b>Si (%)</b>	<b>Na (%)</b>	<b>Cl (%)</b>	<b>Fe (%)</b>
<b>GRUPO Ti</b>	<b>99,829</b>	0,077	0,000	0,039	0,000	0,089
<b>GRUPO TiP</b>	<b>95,490</b>	<b>1,037</b>	0,000	0,049	<b>3,367</b>	0,061
<b>GRUPO TiSi</b>	<b>98,671</b>	0,035	<b>1,091</b>	0,083	0,000	0,194
<b>GRUPO TiSiP</b>	<b>95,288</b>	<b>0,216</b>	<b>1,222</b>	0,025	<b>3,030</b>	0,219

Os resultados da análise de FRX realizada no equipamento Panalytical Axios Max (Figuras 23 e 24) corroboraram os testes preliminares (Tabela 9). A comparação dos picos dos elementos silício (Si) e fósforo (P) nos espectros de fluorescência de raios X nos quatro grupos de estudo revelou picos mais acentuados desses elementos em grupos específicos. A eficácia do processo de silanização foi evidenciada por um pico mais pronunciado de silício (Si) no grupo TiSi em comparação com o grupo Ti. Vale ressaltar que a presença de um pico desse elemento no grupo Ti foi justificada pela inclusão desse elemento na composição da base da amostra necessária para o teste.

A detecção do fósforo (P) no espectro do grupo TiSi pode ser atribuída à presença desse elemento na composição do porta-amostras utilizado na análise. Entretanto, ao analisar os espectros das amostras do grupo TiSi em comparação com as do grupo TiSiP, fica claramente visível que o último exibe um pico de fósforo (P) mais acentuado devido à presença desse elemento no peptídeo pVTK, que está covalentemente ligado à superfície silanizada.

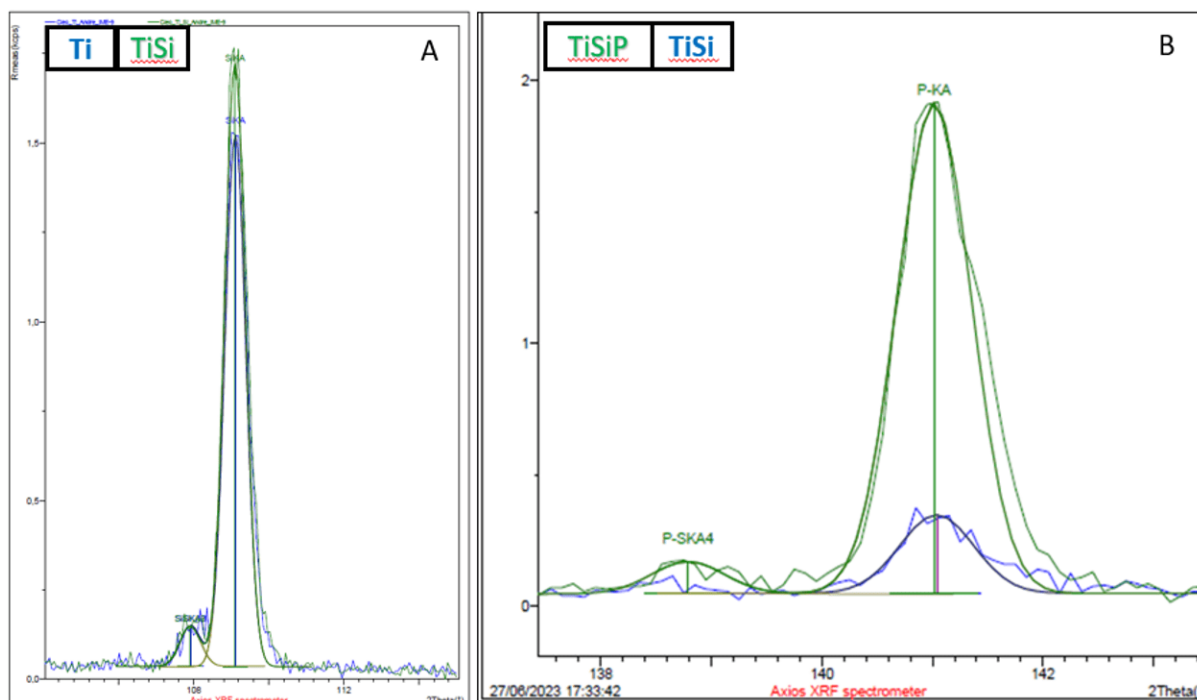


Figura 23 – Espectros de Fluorescência de Raios X comparando picos de silício (Si) em amostras dos grupos Ti e TiSi (A), e fósforo (P) em amostras dos grupos TiSiP e TiSi (B).

Demais gráficos comparando os espectros de Fluorescência de Raios X das amostras dos grupos do presente estudo corroboraram com os resultados encontrados nos espectros da Figura 26. A comparação dos picos dos elementos fósforo (P) entre os grupos TiSi e TiP revelou de forma evidente um pico significativamente mais pronunciado no grupo funcionalizado, confirmando a eficácia da adsorção física do peptídeo pVTK neste grupo (Figura 27A). Enquanto isso, a comparação dos picos dos elementos silício (Si) entre os grupos TiSiP e TiP apresentou claramente um pico muito mais acentuado no grupo silanizado, comprovando a eficácia do método de silanização neste grupo (Figura 27B). É importante destacar que, embora em menor intensidade quando comparado ao pico observado no grupo TiSiP, a presença de um pico de silício no espectro do grupo TiP é atribuída à sua ocorrência na composição da base da amostra.

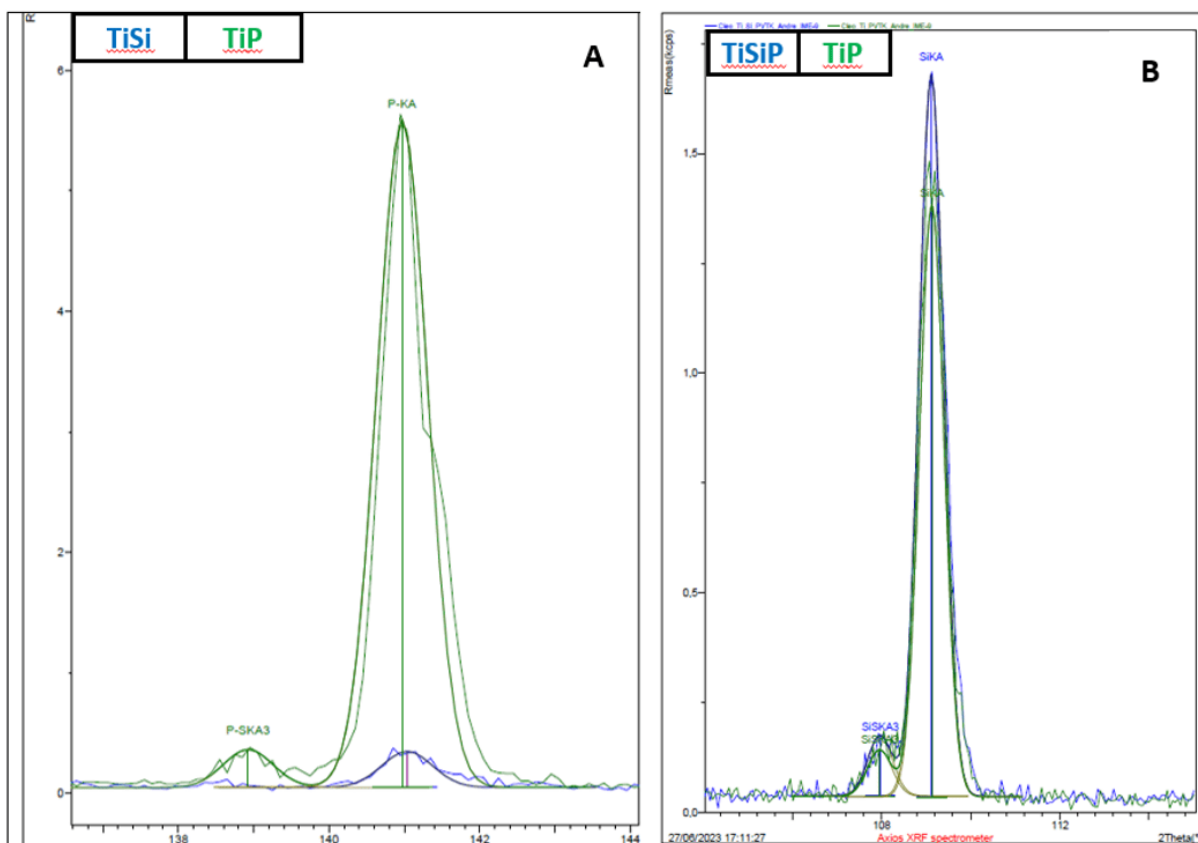


Figura 24 – Espectros de Fluorescência de Raios X comparando picos de fósforo (P) em amostras dos grupos TiSi e TiP (A), e silício (Si) em amostras dos grupos TiSiP e TiP (B).

No estudo conduzido por NALBAND et al. (2014), foi discutido o emprego da técnica de Fluorescência de Raios X (FRX) para a quantificação da capacidade de peptídeos se ligarem a íons metálicos específicos. Este método foi destacado por suas diversas vantagens, sendo amplamente utilizado na ciência dos materiais para determinar a composição elementar de amostras, tornando-se, assim, uma ferramenta versátil para a análise de interações entre superfícies metálicas e compostos químicos. A técnica FRX possibilita a análise simultânea das linhas de emissão de raios X de cada elemento químico presente na amostra, independente da sua forma química. Isso ocorre porque as transições eletrônicas envolvidas no FRX dizem respeito a orbitais eletrônicos internos, tornando a técnica insensível à forma química dos elementos analisados. Tal característica é de grande relevância pois a técnica depende apenas da presença e quantidade do átomo de interesse, independentemente de sua forma química (por exemplo, estado de oxidação ou ligantes) ou do tipo de ligação estabelecida (por exemplo, covalente ou não covalente) (86).

Essa particularidade adquire especial importância no contexto do presente estudo, no qual o peptídeo pVTK foi incorporado à superfície do titânio de duas maneiras distintas nos grupos TiP (por meio de adsorção física) e TiSiP (por ligação covalente à superfície

silanizada). Assim, com base nesses princípios, é possível justificar plenamente a adoção da técnica FRX para a comprovação da ligação do silano à superfície de titânio após a etapa de silanização, bem como para a detecção da presença do peptídeo pVTK nas superfícies de titânio puro (TiP) e titânio silanizado (TiSiP). A técnica FRX se mostra uma escolha adequada para tais análises devido à sua habilidade única de quantificar elementos específicos (como o silício do silano e o fósforo do peptídeo pVTK) nas superfícies de interesse, independentemente de sua forma química ou do tipo de ligação estabelecida.

Consequentemente, a aplicação da técnica FRX viabilizou uma avaliação das interações superficiais de forma inequívoca, confirmando de maneira incontestável a ligação do silano à superfície de titânio e a presença do peptídeo pVTK nas superfícies de titânio puro (TiP) e silanizado (TiSiP). A notável vantagem da técnica XRF, devido à sua capacidade intrínseca de quantificar elementos específicos em amostras complexas, a consolida como uma ferramenta inestimável para a investigação de superfícies em biomateriais.

#### 4.2.2 Teste de Citotoxicidade / Viabilidade Celular

A avaliação de citotoxicidade é uma prática comum em pesquisas biomédicas, essencial para identificar compostos não tóxicos e garantir a biocompatibilidade de dispositivos médicos, como estipulado pela ISO 10993. A citotoxicidade refere-se à capacidade de uma substância prejudicar células vivas, e é um aspecto crítico a ser considerado na pesquisa de novos materiais e na segurança clínica (87, 88).

No contexto das avaliações de citotoxicidade, os testes em cultura celular são particularmente relevantes, pois permitem uma análise detalhada da resposta das células à exposição a diferentes materiais e substâncias. Esses testes são valiosos para determinar o nível de toxicidade que um composto possui nas células, observando alterações morfológicas e funcionais.(89).

Existem diferentes categorias de testes de citotoxicidade definidos pela ISO 10993, incluindo o teste de diluição de extrato, o teste de contato direto e o teste de contato indireto. O teste de diluição de extrato é comumente utilizado para avaliar a citotoxicidade *in vitro* de materiais e dispositivos médicos. Este método visa detectar substâncias citotóxicas lixiviadas de superfícies expostas por meio da análise de extratos de materiais. A avaliação da citotoxicidade dos extratos é baseada nas alterações morfológicas e funcionais das células expostas a esses extratos (88, 90).

Vários ensaios, como o ensaio à base de sal de tetrazólio (MTT), o ensaio MTS, o ensaio WST e o ensaio vermelho neutro (NR), são utilizados para o teste de diluição de extrato. Esses ensaios apresentam desempenho semelhante na avaliação da citotoxicidade química e produzem correlações consistentes. A porcentagem de viabilidade celular é

calculada com base na taxa de sobrevivência das células expostas aos extratos (91).

Além disso, o método de formazan solúvel em água (WST) é uma alternativa ao ensaio MTT e demonstra maior sensibilidade e eficiência na medição da viabilidade bacteriana. O WST é útil para determinações robustas de NAD(P)H e oferece uma faixa linear mais ampla e maior sensibilidade. No entanto, apesar dessas vantagens, o ensaio MTT ainda é amplamente empregado (87).

No presente estudo, os resultados foram analisados em software estatístico Prism versão 5.00 (GraphPad Software, Califórnia, Estados Unidos), e foram realizados testes para verificar se os dados seguem uma distribuição normal. O ensaio de citotoxicidade/viabilidade celular utilizando o método WST-1 também não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Isso significa que nenhum dos materiais testados demonstrou ser citotóxico quando expostos aos extratos.

Conforme mostrado na Figura 25, o percentual de células viáveis de cada grupo após 24h de exposição ao extrato foi de: TiSiP 85% ( $\pm 6,71$ ), TiSi 89% ( $\pm 5,99$ ), Ti 111% ( $\pm 5,45$ ) e TiP 104,4% ( $\pm 5,40$ ). Após 48h de exposição ao extrato, o percentual de células viáveis foi de: TiSiP 116,6% ( $\pm 13,78$ ), TiSi 98% ( $\pm 15,21$ ), Ti 93% ( $\pm 7,92$ ) e TiP 99,6% ( $\pm 8,96$ )

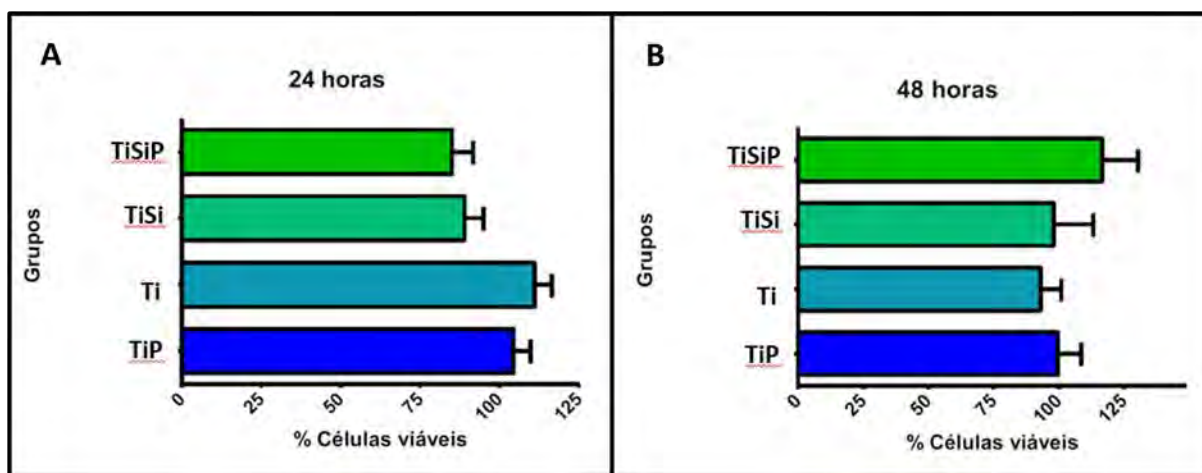


Figura 25 – Percentual de células viáveis após exposição 24 h (A) e 48 h (B) ao extrato.

Os resultados do teste de citotoxicidade das amostras contendo pVTK são consistentes com os resultados de DO NASCIMENTO et al. (2023), no qual também foi avaliada a viabilidade de células expostas a esse peptídeo, utilizando o ensaio WST-1. No estudo mencionado, os autores investigaram o percentual de viabilidade celular em pastilhas de fosfato de cálcio biofuncionalizadas com pVTK, obtendo os resultados de 106% após 24 horas e 129% após 48 horas. Os resultados de Do Nascimento são semelhantes aos encontrados no presente estudo reforçando a evidência de que o peptídeo pVTK não

demonstra capacidade citotóxica significativa em ensaios de exposição celular e sugere sua potencial aplicação em materiais biomédicos (18).

A razão pela qual alguns dos resultados obtidos no teste de viabilidade celular pelo método WST-1 estão acima de 100% pode ser devido ao uso do grupo controle como referência. Nesse tipo de teste, a absorvância do grupo controle (que representa células vivas sem exposição a substâncias tóxicas) é usada como base para calcular a viabilidade celular dos grupos experimentais.

A Equação 4.4 representa a fórmula geral para o cálculo da viabilidade celular:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorvância (grupo experimental)}}{\text{Absorvância (grupo controle)}} \times 100 \quad (4.1)$$

Se a absorvância do grupo experimental for menor do que a do grupo controle, o resultado será inferior a 100%, o que indica que as células experimentais foram afetadas negativamente e sua viabilidade é menor em comparação com o grupo controle.

Por outro lado, se a absorvância do grupo experimental for maior do que a do grupo controle, isso pode ocorrer por várias razões. Pode indicar que as células experimentais estão mais ativas metabolicamente ou que a reação colorimétrica foi mais intensa nas células do grupo experimental do que nas do grupo controle. Portanto, em algumas situações, os resultados podem superar 100%.

Essa é uma razão pela qual é importante incluir um grupo controle em experimentos desse tipo, pois ele fornece uma base para a comparação e interpretação dos resultados dos grupos experimentais.

### 4.2.3 Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS)

A caracterização química da amostra do grupo controle negativo (grupo Ti) após 14 dias de imersão no meio McCoy confirmou nossas expectativas. Essa análise não revelou a presença de cálcio (Ca) ou fósforo (P) em sua composição. Dentre as regiões analisadas, uma delas representada na Figura 26, a superfície foi essencialmente caracterizada pela presença quase exclusiva do elemento titânio (Ti), que correspondeu a um valor médio superior à 98,00% em peso da composição (tabela 10).

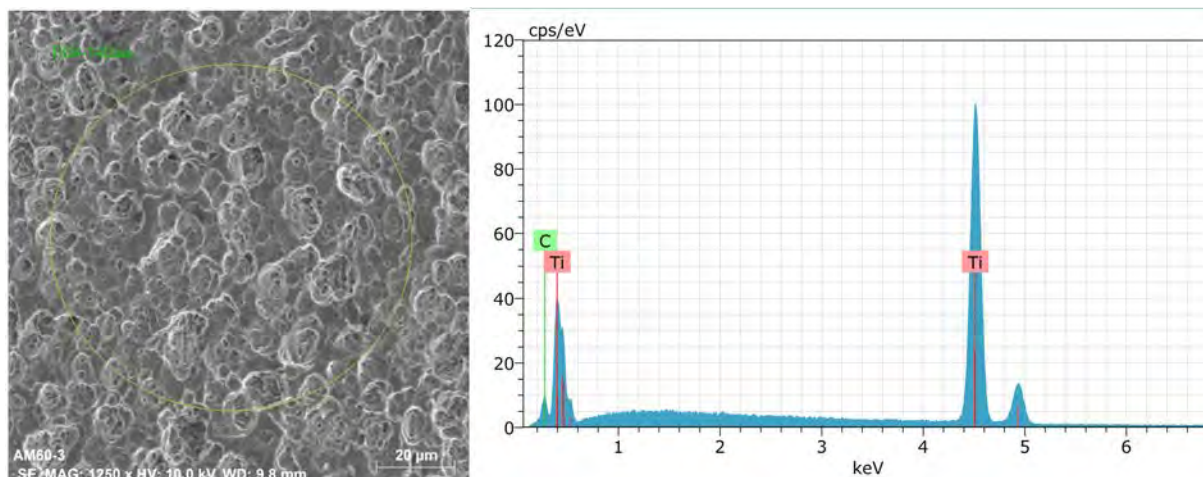


Figura 26 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo controle negativo (grupo Ti) após 14 dias em Meio McCoy.

Tabela 10 – Caracterização química (EDS) da superfície da amostra do grupo controle negativo (grupo Ti) após 14 dias em Meio McCoy.

Grupo Ti - 14 dias	Região 1		Região 2		Média	
	Peso %	% Atômico	Peso %	% Atômico	Peso %	% Atômico
Ti	98,80	95,40	98,55	94,45	98,67	94,92
C	1,20	4,60	1,45	5,55	1,33	5,08
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Os resultados da análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) da amostra do grupo TiP (Figura 27), após um período de 14 dias de imersão no meio McCoy, revelam observações cruciais em relação à bioatividade e mineralização da superfície do titânio. Neste contexto, destaca-se que a ausência dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície amostral é um resultado de grande relevância que requer uma análise aprofundada.

Inicialmente, merece destaque o fato de que a superfície da amostra apresentou características semelhantes ao grupo controle negativo, com uma predominância de titânio (98,49% de Ti) (Tabela 11). Isso indica que a incorporação do peptídeo de ligação pVTK à superfície do titânio por meio de adsorção física não resultou na promoção esperada da mineralização. Este resultado não permite estimar resultados futuros, conforme indicado por pesquisas prévias (18), onde a introdução do peptídeo pVTK era prevista para acelerar o processo de formação de minerais, um aspecto fundamental para a bioatividade de biomateriais.

A bioatividade das superfícies de implantes é crucial para a integração bem-sucedida de dispositivos biomédicos com os tecidos hospedeiros. Nesse sentido, a ausência de mineralização na superfície de titânio do grupo TiP após 14 dias de funcionalizada com



o peptídeo pVTK não apresenta eficácia desse agente de funcionalização quando aderido fisicamente à superfície do titânio.

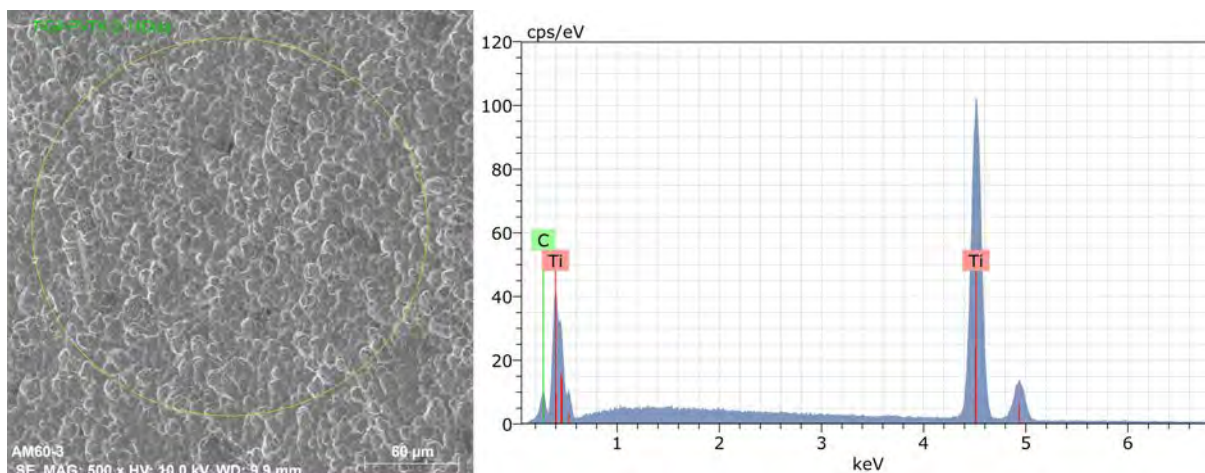


Figura 27 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo experimental TiP após 14 dias em Meio McCoy.

Tabela 11 – Caracterização química (EDS) da superfície da amostra do grupo experimental TiP após 14 dias em Meio McCoy.

Grupo TiP - 14 DIAS		
Elemento	Concentração Normalizada [Peso %]	Concentração Atômica [% Atômico]
<b>Ti</b>	98,49	94,26
<b>C</b>	1,51	5,74
TOTAL	100,00	100,00

Os resultados obtidos na análise por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) revelaram a presença dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície das amostras dos grupos submetidos à silanização (TiSi e TiSiP). Isso sugere que a formação da camada superficial de apatita está principalmente relacionada aos grupos que passaram pelo processo de silanização, independentemente da presença do peptídeo em sua superfície. Essa observação é facilmente explicada pelo tratamento alcalino necessário para a criação de grupos hidroxilas ( $OH^-$ ) antes da etapa de silanização.

Embora a técnica de silanização permita a adesão eficaz do silano à superfície do titânio, a etapa de ativação da superfície por meio do tratamento alcalino tem como consequência a formação de uma camada amorfa de titanato de sódio sobre o metal. Quando essa camada entra em contato com um fluido que apresenta condições iônicas ideais, ela tem a capacidade de passar por um processo de cristalização, resultando na transformação em apatita. Esse fenômeno confere ao material um nível significativo de bioatividade, como previamente abordado em estudos científicos anteriores (14, 15).

Na análise por MEV-FEG, sob uma magnificação de 1250X, representada pela Figura 28 e pelas regiões 1 e 2 da Tabela 12, observou-se que as amostras do grupo TiSi, após 14 dias em meio McCoy, apresentaram a formação de partículas esferoidais de apatita ao longo de sua superfície. No entanto, ao aumentar a magnificação para valores superiores a 10.000X, como representado pela Figura 29 e nas regiões 3 e 4 da Tabela 13, também foi possível observar a presença de precipitações que formavam regiões mais texturizadas e não aglomeradas. A análise das diferentes regiões dessa mesma superfície revelou proporções distintas dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) em sua composição. Essa detecção indica que o tratamento químico do titânio com NaOH teve um impacto na formação de apatita, semelhante ao osso, na superfície das amostras desse grupo. A formação de apatita semelhante ao osso está associada a variações na concentração de fosfatos e cálcio na solução, embora o processo não seja completamente uniforme e possa também ser influenciado pelas características da superfície do titânio de acordo com seu processo de tratamento.

Esses resultados estão em conformidade com o estudo realizado por JONÁŠOVÁ et al. (2004), que se concentrou na preparação de amostras de titânio comercialmente puro e sua exposição a diferentes condições químicas, incluindo imersões em solução de SBF, para avaliar a formação de apatita hidroxicarbonatada (HCA) na superfície das amostras tratadas com HCl e, posteriormente, com NaOH, antes de serem submetidas ao SBF (92).

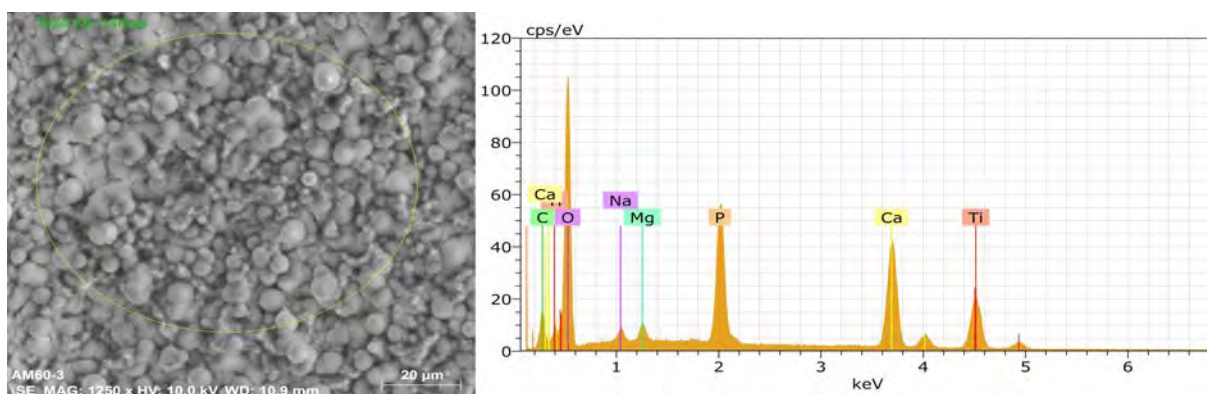


Figura 28 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo controle positivo TiSi após 14 dias em Meio McCoy - 1250X.

Tabela 12 – Caracterização química (EDS) da superfície da amostra do grupo controle positivo (grupo TiSi) após 14 dias em Meio McCoy - 1250X.

Grupo TiSi - 14 dias	Região 1		Região 2		Média	
	Peso %	% Atômico	Peso %	% Atômico	Peso %	% Atômico
O	41,14	60,40	41,31	60,80	41,22	60,60
Ti	21,88	10,74	22,36	11,00	22,12	10,87
Ca	21,20	12,43	22,55	13,25	21,88	12,84
P	10,66	8,08	8,95	6,81	9,81	7,44
C	3,39	6,63	3,46	6,79	3,43	6,71
Mg	0,90	0,87	0,69	0,67	0,79	0,77
Na	0,83	0,85	0,67	0,69	0,75	0,77
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

As análises de EDS em baixa magnificação (1250X) permitiram detectar um percentual atômico de cálcio de 12,43% e fósforo de 8,08% na região 1, enquanto na região 2, os valores foram de 13,25% para cálcio e 6,81% para fósforo (Tabela 12). O cálculo da proporção Ca/P com base na média dos percentuais atômicos dessas regiões resultou em um valor de 1,72, o qual é compatível com a proporção Ca/P estequiométrica da hidroxiapatita. A relação entre cálcio e fósforo possui relevância, com sua importância variando de acordo com o campo de estudo. Em biologia e ciência de materiais biomédicos, uma relação Ca:P adequada influencia na formação e estabilidade de materiais e tecidos mineralizados, como ossos e dentes. Embora essa proporção possa variar em diferentes contextos, frequentemente uma relação Ca/P próxima a 1,67 é associada à hidroxiapatita, que constitui o principal componente mineral dos tecidos duros do corpo humano (93).

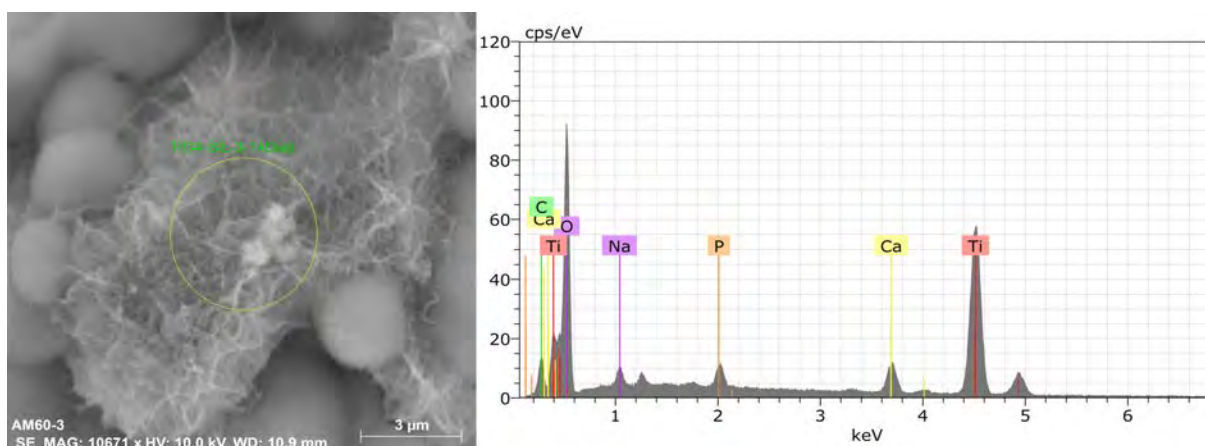


Figura 29 – Espectro de EDS da superfície da amostra do grupo controle positivo TiSi após 14 dias em Meio McCoy - 10.000X.

Tabela 13 – Caracterização química (EDS) da superfície da amostra do grupo controle positivo (grupo TiSi) após 14 dias em Meio McCoy - 10.000X.

Grupo TiSi - 14 dias	Região 3		Região 4		Média	
	Peso %	% Atômico	Peso %	% Atômico	Peso %	% Atômico
O	37,71	61,60	41,76	65,32	39,73	63,46
Ti	53,92	29,43	48,92	25,57	51,41	27,50
Ca	4,47	2,91	5,16	3,22	4,82	3,06
P	1,18	0,99	1,54	1,25	1,36	1,12
C	1,89	4,11	1,80	3,76	1,85	3,94
Na	0,84	0,95	0,81	0,88	0,83	0,92
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Nas análises de EDS das regiões 3 e 4 do grupo TiSi, observou-se que, a partir de magnificações superiores a 10.000X (Tabela 13), as concentrações normalizadas (% em peso) dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) diminuíram consideravelmente. Isso ocorreu devido à ausência de partículas aglomeradas de apatita semelhante ao osso nessas regiões. Esse fenômeno foi observado de forma consistente em todas as regiões analisadas do grupo TiSiP, independentemente da região e da magnificação selecionada para a análise.

Os resultados do grupo TiSi estavam em conformidade com as expectativas devido ao tratamento alcalino com NaOH aplicado nas amostras desse grupo. Esse tratamento teve como objetivo ativar a superfície de titânio para facilitar a ancoragem do peptídeo pVTK. Como consequência desse processo, formou-se uma camada de titanato de sódio com grupos Ti-OH em sua superfície, que possui carga negativa. Em um ambiente adequado, como o SBF ou McCoy, esses grupos Ti-OH se ligam seletivamente aos íons  $Ca^{2+}$  do meio, que têm carga positiva, formando assim o titanato de cálcio. Com o acúmulo gradual de íons cálcio na superfície, ela adquire uma carga global positiva e se combina com íons fosfato, que são carregados negativamente, resultando na formação de fosfato de cálcio amorfo. Esse fosfato de cálcio, por sua vez, espontaneamente se converte em apatita, que é a fase mais estável em um ambiente corporal (14, 15).

Na análise de EDS do grupo TiSiP, independentemente da ampliação no MEV-FEG e da região selecionada, não foi possível detectar a presença de partículas aglomeradas em formato esférico em nenhum ponto durante a exposição ao meio McCoy. As figuras 30 e 31 ilustram essa constatação, apresentando os espectros de EDS e micrografia de MEV-FEG em diferentes regiões, com ampliações de 1250X e 10.000X, respectivamente. Essa observação sugere uma menor precipitação de apatita semelhante ao osso no grupo TiSiP em comparação com o grupo TiSi. Esse resultado indica uma diferença significativa na capacidade de formação de apatita semelhante ao osso entre os dois grupos.



Considerando a média dos percentuais em peso de cálcio e fósforo encontrados nas regiões 1 e 2 do grupo TiSi, o resultado para o cálcio (Ca) foi de 21,88%, enquanto para o fósforo (P) foi de 9,81% (Tabela 12). Em contraste, na primeira região analisada do no grupo TiSiP, esses percentuais foram significativamente reduzidos, com 3,86% para o cálcio e 0,69% para o fósforo (Tabela 14).

Sendo assim, é importante destacar que os percentuais de peso dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) encontrados nos dois grupos com amostras silanizadas são significativamente diferentes. Ao comparar os resultados dos grupo experimental (TiSiP) e grupo controle positivo (TiSi), observou-se uma concentração de peso percentual aproximadamente 5 vezes superior para o Ca e 15 vezes superior para o P nas amostras do grupo TiSi em comparação com o grupo TiSiP.

Os espectros de EDS representativos dos grupos estudados fornecem uma clara evidência da ausência dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) nos grupos Ti e TiP, que não foram submetidos ao tratamento alcalino. Esse resultado reforça a indicação de que a funcionalização da superfície de titânio bioinerte com o peptídeo pVTK não possui um efeito positivo na bioatividade desse material quando imerso em meio McCoy.

Em contrapartida, nos grupos silanizados, e portanto bioativados previamente pelo tratamento alcalino, a presença desses elementos foi identificada com percentuais significativamente diferentes, com destaque para o grupo TiSi, que apresentou uma maior concentração em comparação ao grupo TiSiP.

#### 4.2.4 Morfologia Após Imersão em Meio McCoy

Mostra-se da Figura 32 até a Figura 46 a morfologia das superfícies das amostras após a imersão em meio McCoy. A análise das imagens de micrografia de MEV-FEG das amostras pertencentes aos quatro grupos de estudo, coletadas após 3, 7 e 14 dias em Meio McCoy, apresentou coerência com os resultados das análises de EDS e FRX. Durante os períodos analisados não foi possível identificar a formação de precipitações de apatita semelhante ao osso nas amostras dos grupos de Ti e TiP.

Após a imersão durante 3 dias em meio McCoy, a análise das amostras silanizadas (TiSi e TiSiP) indicou a presença de precipitações, visíveis em aumentos superiores a 1.000X. No entanto, ao aumentar a magnificação para 10000X e 20000X, as amostras apresentam comportamento semelhante em ambos os grupos (Figuras 32 a 36), possivelmente influenciadas pela bioatividade intrínseca das superfícies devido ao tratamento alcalino.

Até o período de 3 dias, não foi observada nenhuma influência do peptídeo pVTK no perfil das precipitações. Estes resultados estão em consonância com os estudos de JONÁŠOVÁ et al. (2004), que em análise da superfície de titânio submetida a tratamento alcalino (10 M de NaOH a 60°C por 24 h) e mantida em Solução de Fluidos Simulados (SBF) por diferentes períodos (2, 10, 14 e 20 dias), não encontraram aglomerados esféricos de partículas de apatita durante o primeiro período de estudo (92).

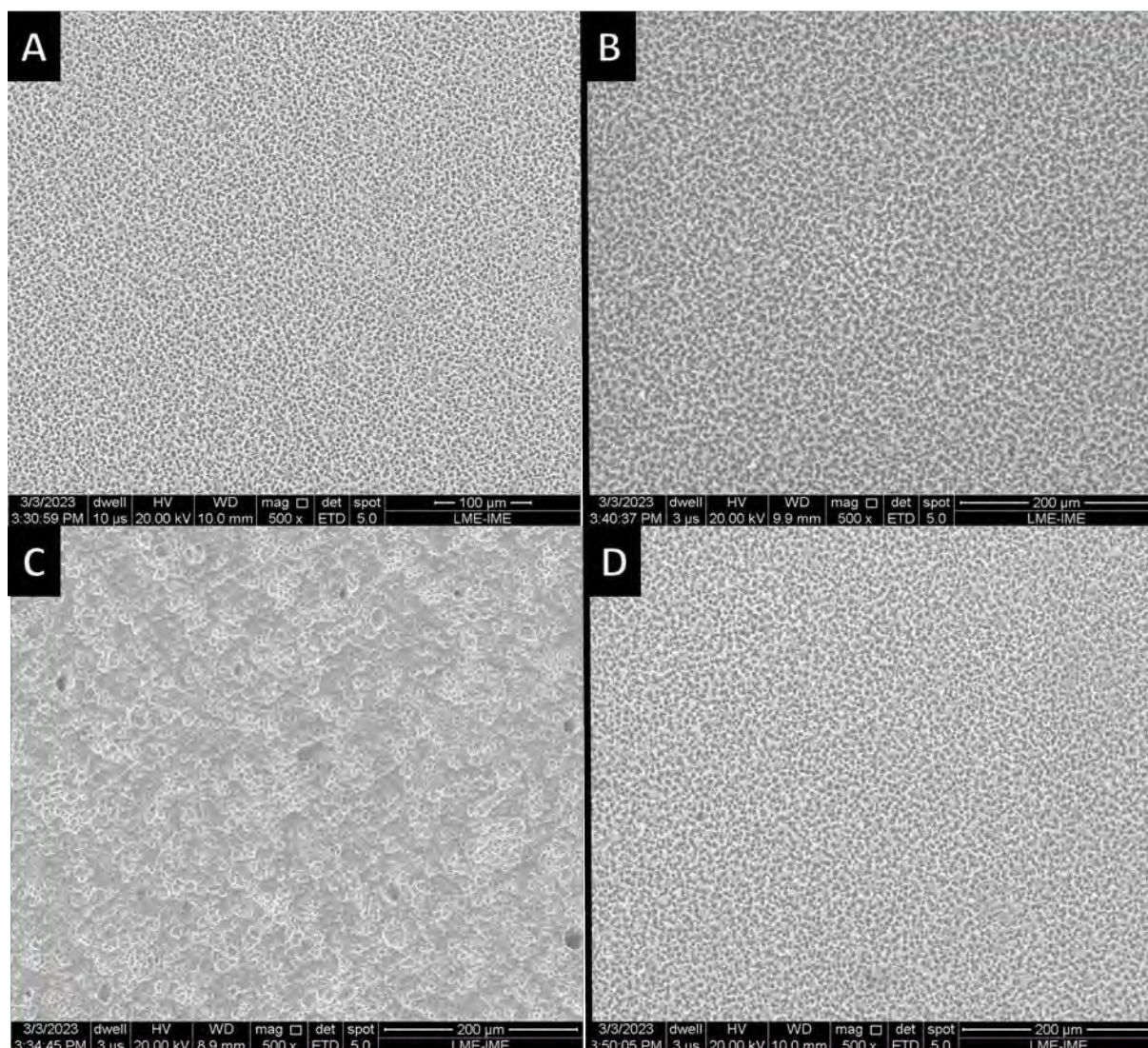


Figura 32 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 500X.

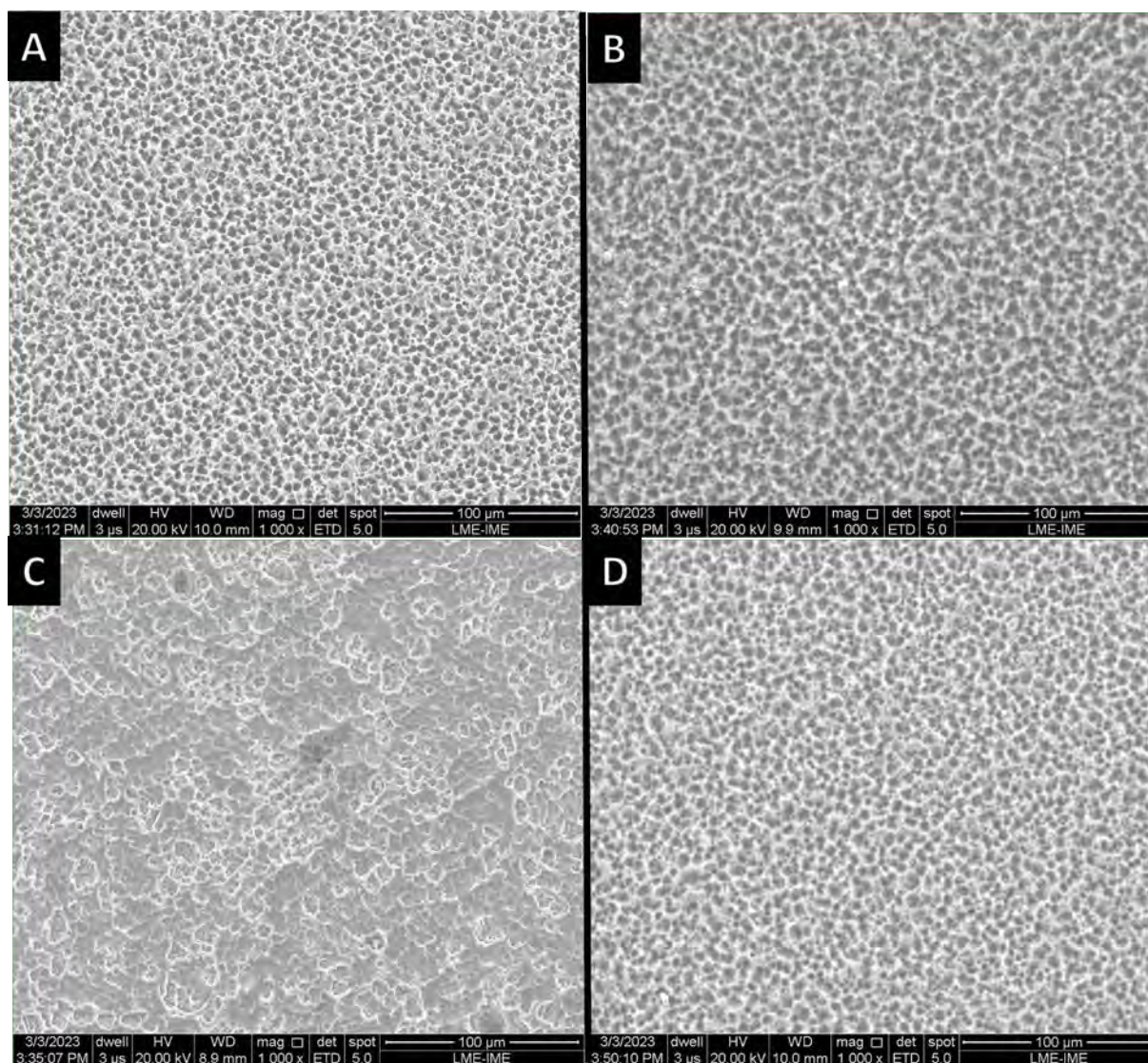


Figura 33 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 1000X.



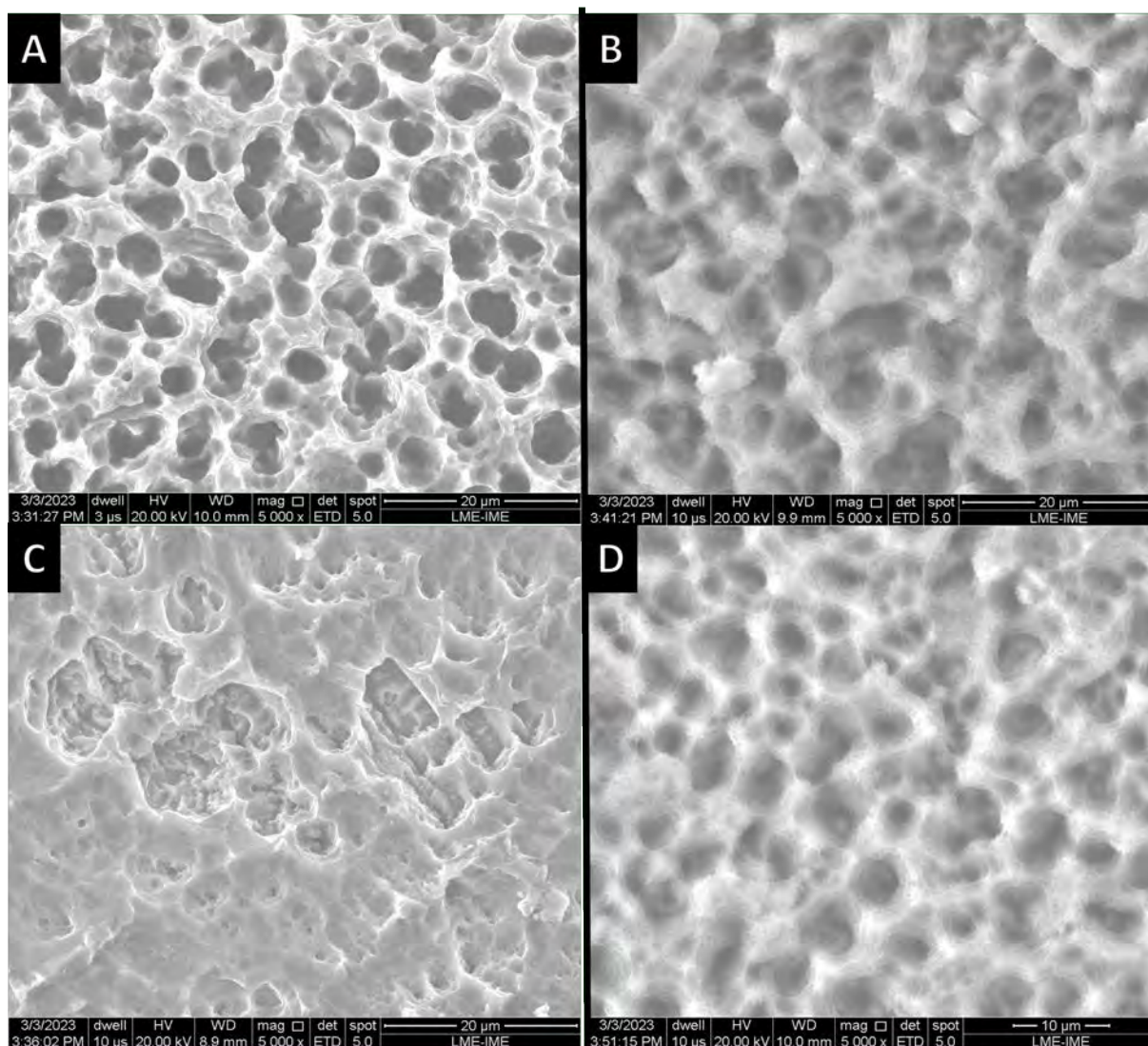


Figura 34 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 5000X.

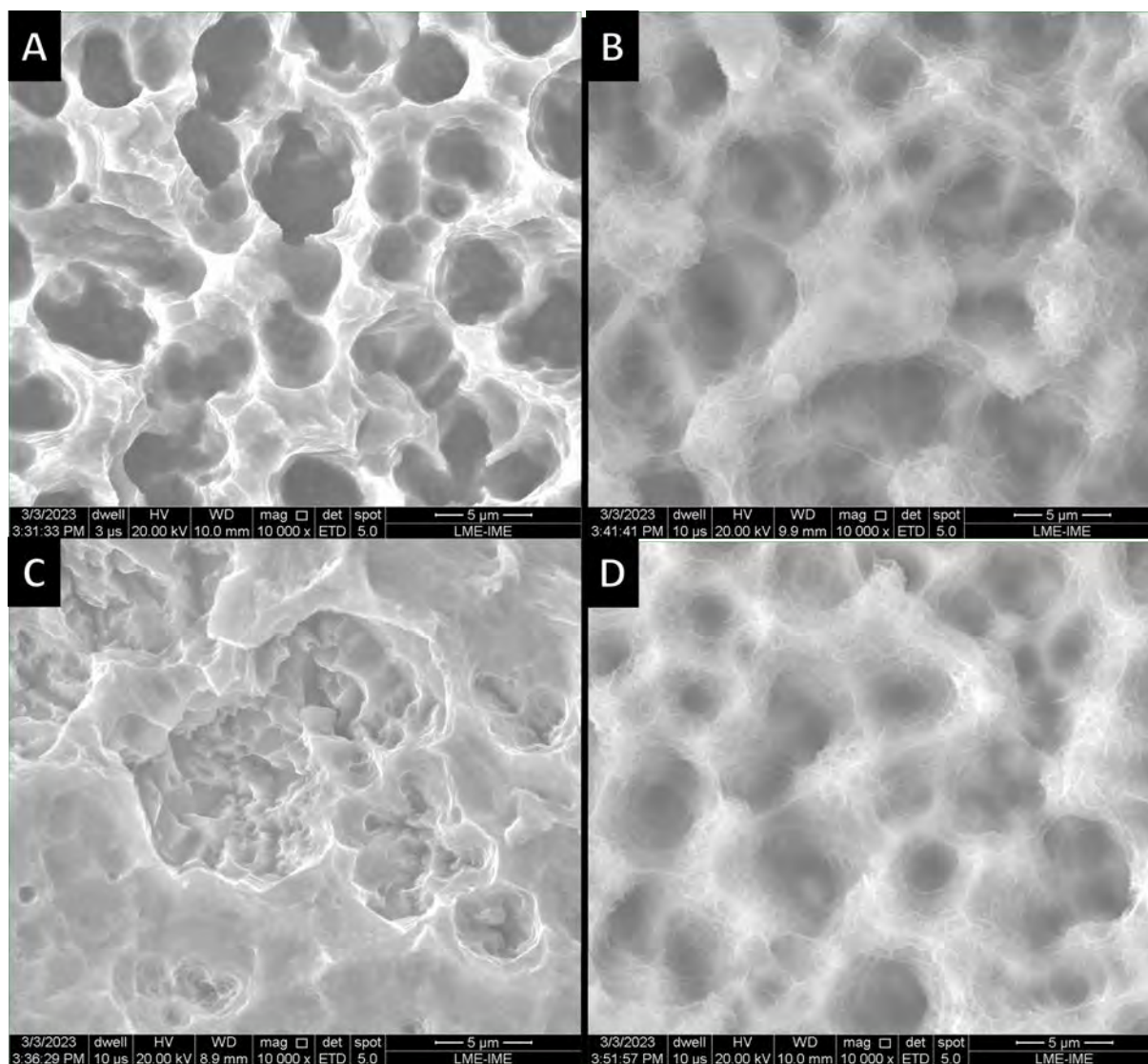


Figura 35 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 10000X.

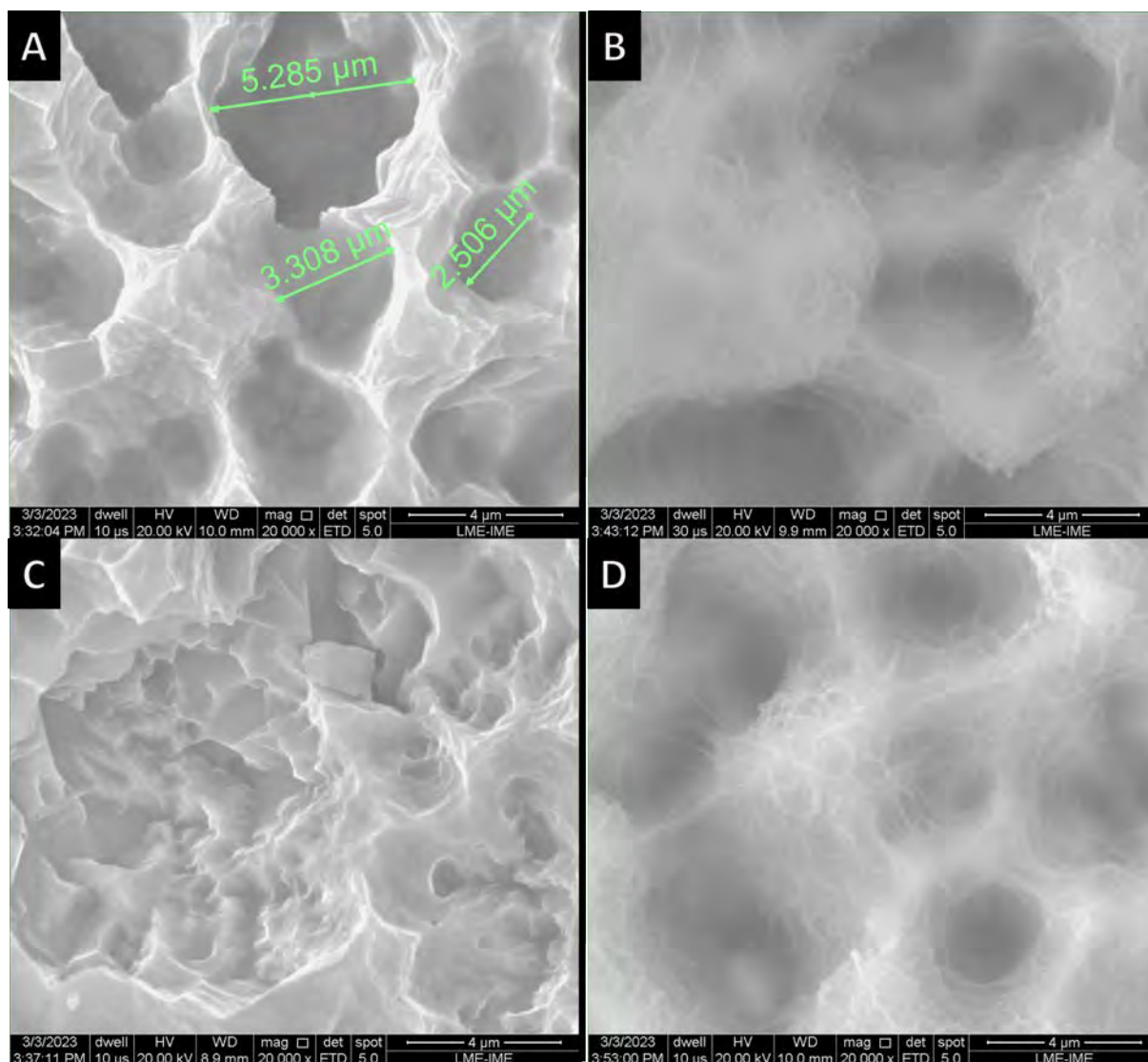


Figura 36 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 3 dias em Meio McCoy - 20000X.

Em consonância com os resultados das análises de EDS e FRX, as amostras dos grupos TiSi e TiSiP exibiram níveis apreciáveis de bioatividade ao longo dos três períodos de estudo. Ao analisar as imagens de micrografia obtidas por MEV-FEG das amostras dos dois grupos silanizados, especialmente após o período de 7 dias (Figuras 37 a 41), tornou-se mais evidente uma reduzida precipitação de apatita, de características semelhantes ao osso, no grupo funcionalizado (TiSiP) em comparação com o grupo apenas silanizado (TiSi). Isso sugere, portanto, a possibilidade de uma influência negativa do peptídeo pVTK na bioatividade das amostras de titânio silanizado quando submetidas ao teste de bioatividade em meio McCoy.

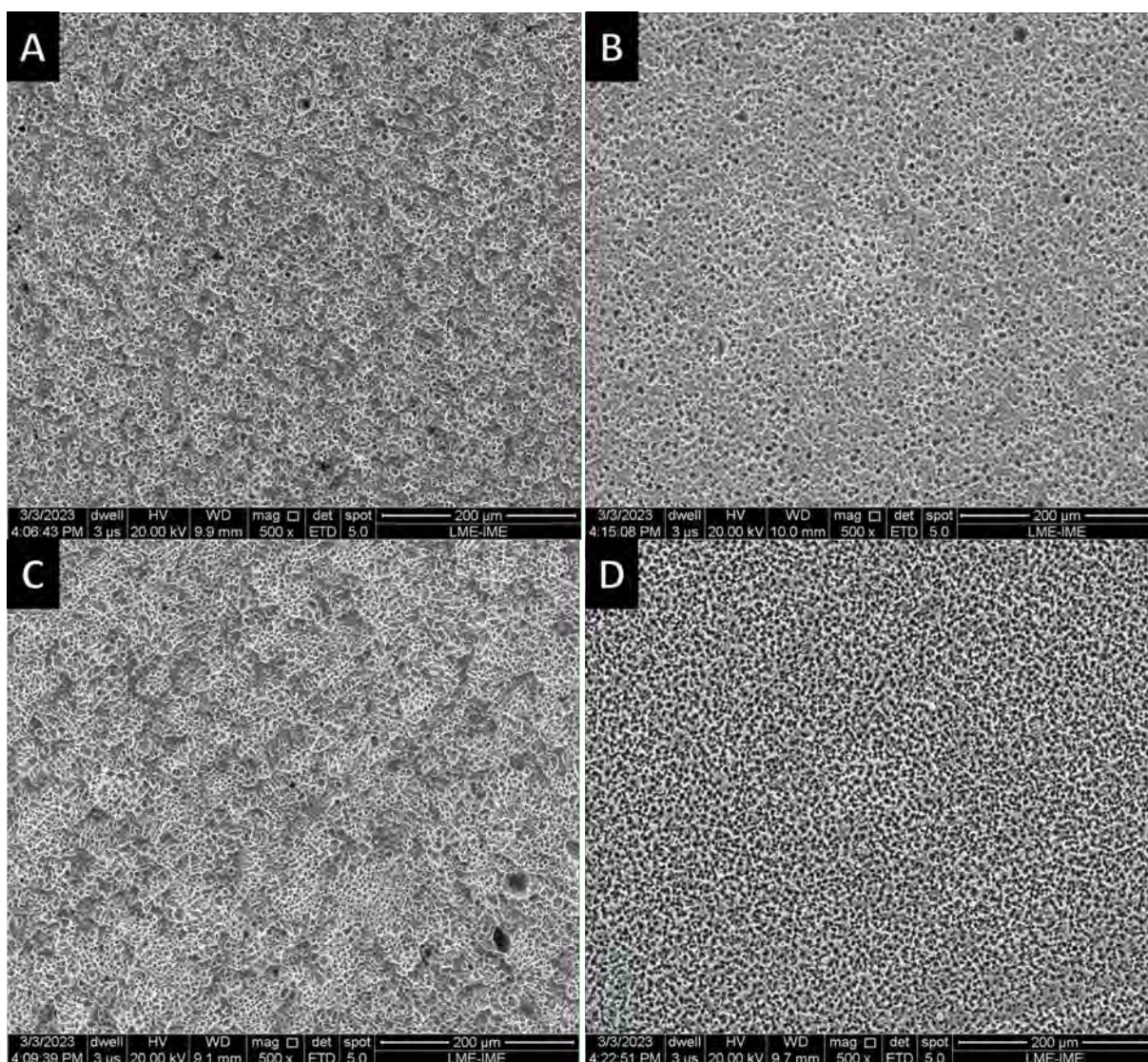


Figura 37 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 500X.

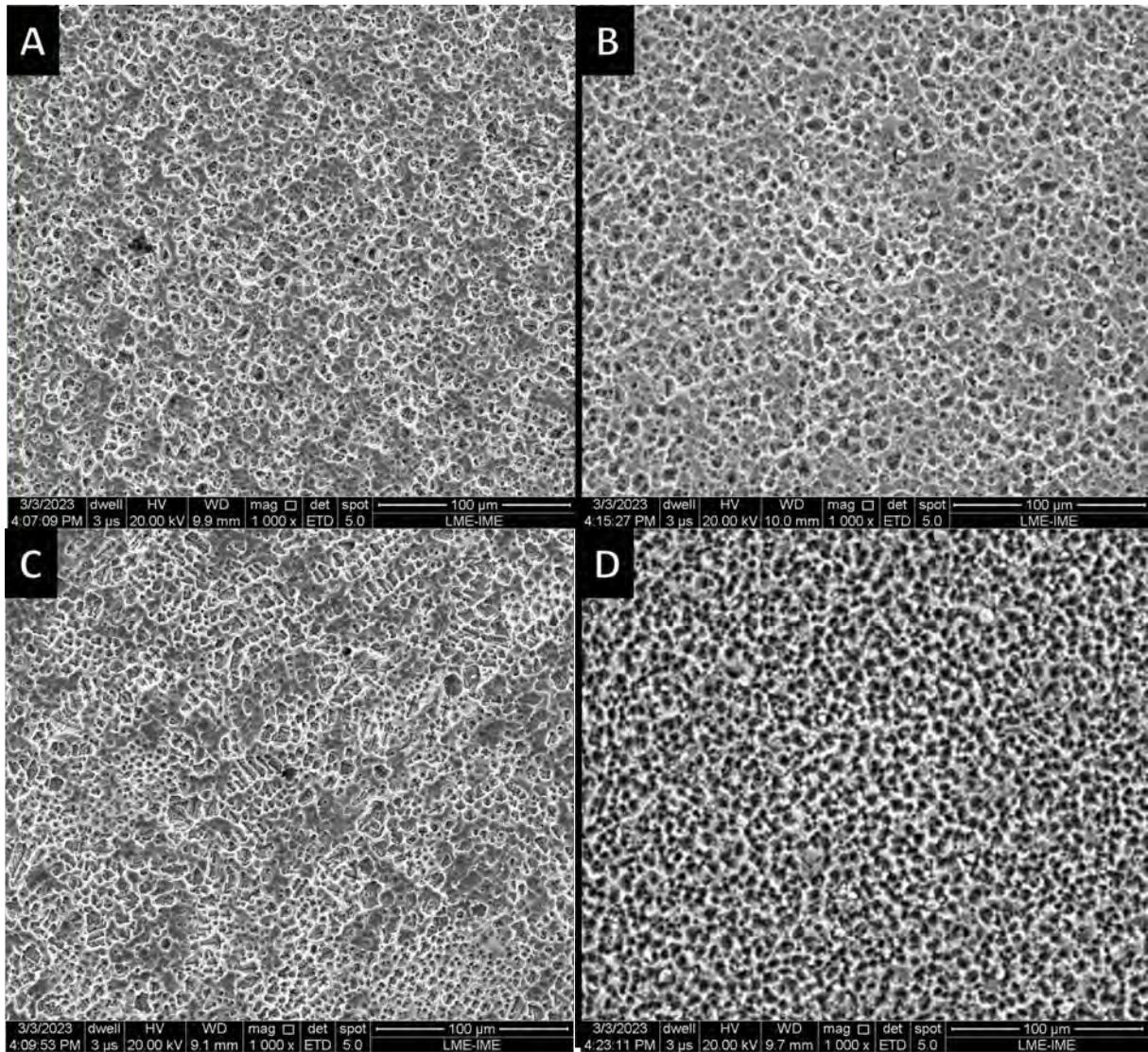


Figura 38 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 1000X.

Embora não tenha sido observado aglomerados esféricos nas amostras dos grupos TiSi e TiSiP após um período de 7 dias mantidos em meio McCoy, é possível notar uma diferença significativa, especialmente em magnificações de MEV-FEG superiores a 5000X. A partir desses aumentos, observa-se uma camada mais texturizada e uniforme de precipitação de apatita nas amostras do grupo TiSi em comparação com o grupo TiSiP. Essa diferença é mais acentuada em aumentos de 20.000X, onde no grupo TiSiP observamos uma superfície mais porosa com falhas ou *gaps*, sugerindo regiões que não receberam precipitação de apatita.

Estas observações constituíram as primeiras indicações obtidas no presente estudo, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (MEV-FEG), de uma possível influência *in vitro* da presença do pVTK na superfície das amostras TiSiP. Essa influência pode afetar a uniformidade e a textura das precipitações de apatita em comparação com as amostras do grupo TiSi.

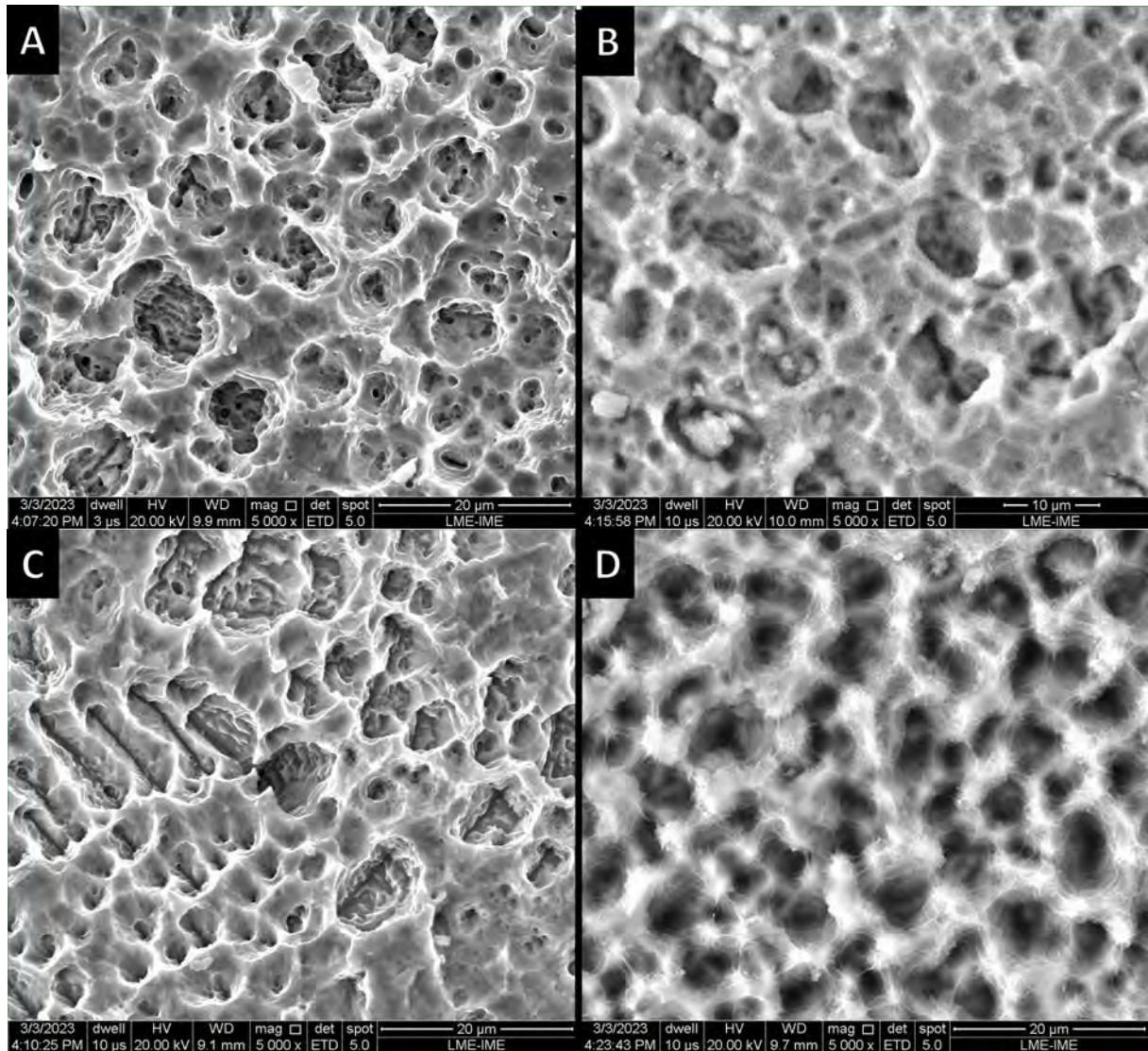


Figura 39 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 5000X.

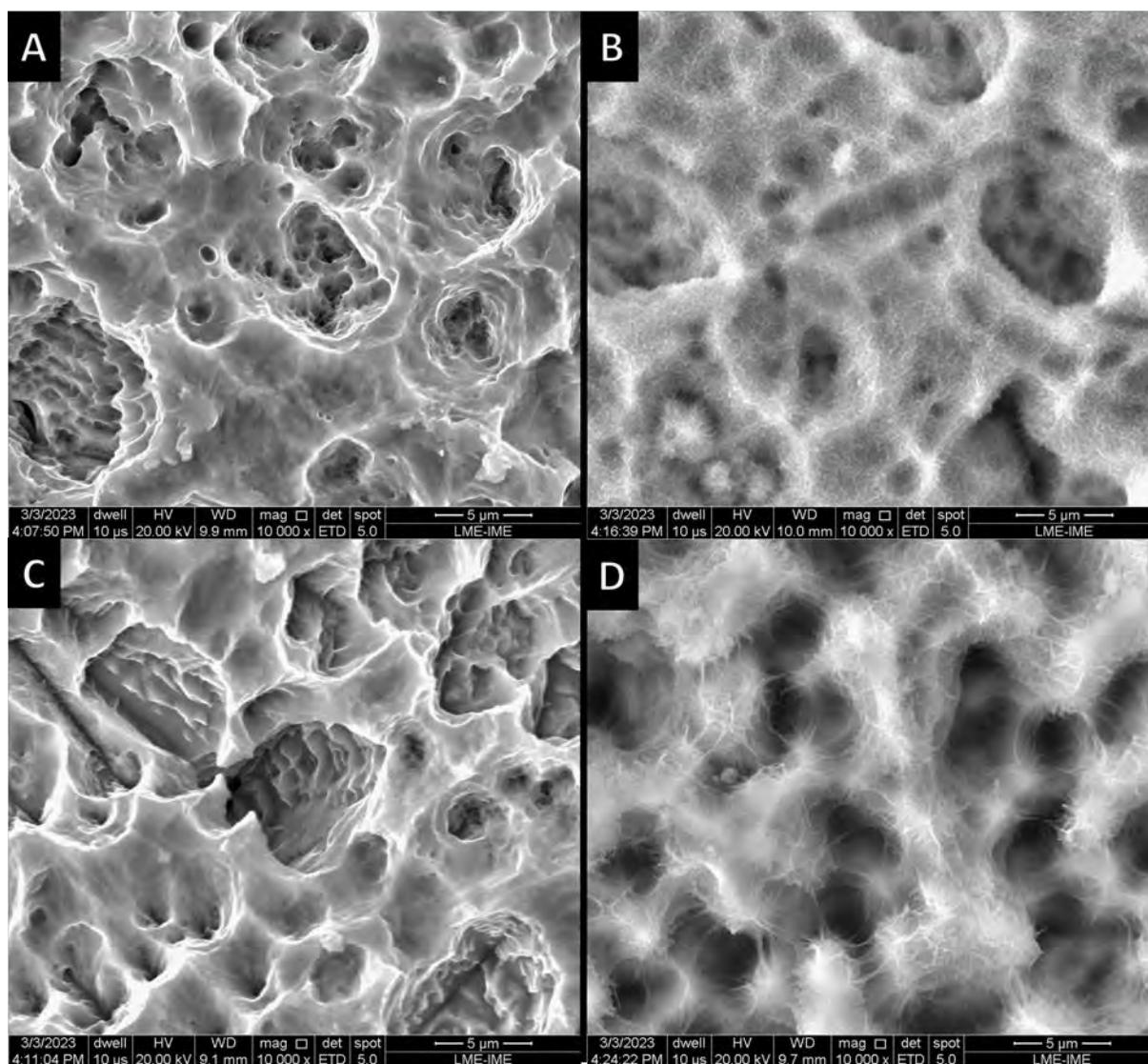


Figura 40 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 10000X.

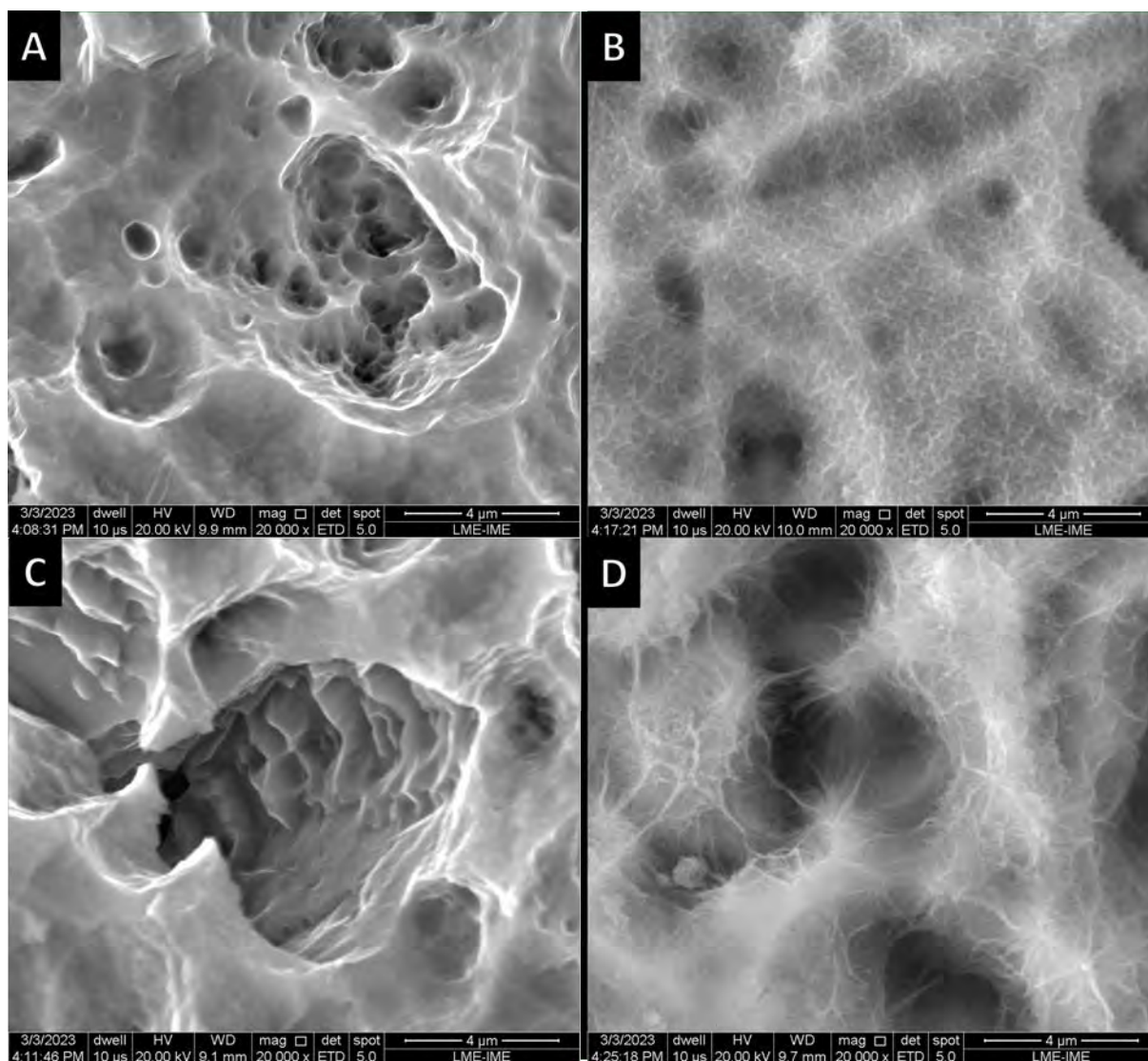


Figura 41 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 7 dias em Meio McCoy - 20000X.



As amostras dos grupos TiSi e TiSiP imersas durante 14 dias em meio McCoy (Figuras 42 a 46) apresentaram morfologias diferentes. A partir de uma ampliação de 1000X (figura 43), as amostras do grupo TiSi apresentam uma alta densidade de aglomerados esféricos, sugerindo uma intensa bioatividade. Este comportamento é ainda mais perceptível nas ampliações de 10000X e 20000X (Figuras 45 e 46). Esses aglomerados esféricos são consistentes com resultados semelhantes relatados por JONÁŠOVÁ et al. (2004), onde amostras de titânio bioativadas por tratamento alcalino também exibiram aglomerados a partir de 10 dias de imersão em SBF (92).

No grupo TiSiP, apesar de algum potencial bioativo, a ausência de precipitações em formato de esferas, mesmo em ampliações mais elevadas após 14 dias em meio McCoy, sugere uma menor bioatividade em comparação com o grupo não funcionalizado. Isso é um forte indício da regulação negativa exercida pelo peptídeo pVTK na precipitação e aglomeração de partículas de apatita em meio McCoy.

Esses resultados vão de encontro aos relatados por DO NASCIMENTO et al. (2023), que sugeriram uma maior bioatividade *in vitro* de pastilhas de fosfato de cálcio biofuncionalizadas com pVTK. No entanto, a inibição da mineralização devido à ação do peptídeo pVTK já havia sido documentada em estudos anteriores que avaliaram a capacidade de mineralização de células pré-osteoblásticas em meios osteogênicos (21, 94).

Um estudo anterior realizado por Ramaswamy et al. (2015) envolveu culturas de células MC3T3 em meio osteogênico puro e no mesmo meio suplementado com 300  $\mu\text{m}$  de peptídeo pVTK. Os autores constataram a inibição da mineralização pelas células entre o sétimo e o décimo segundo dia de observação (21). No entanto, a interferência negativa do peptídeo pVTK no processo de mineralização, que foi associada a uma redução das atividades enzimáticas e à interrupção da diferenciação osteogênica, ainda não havia sido observada em testes *in vitro* de bioatividade, simulando apenas a etapa inorgânica da mineralização, por meio da troca iônica entre a superfície de um biomaterial e o meio circundante, e portanto, sem a presença de células.

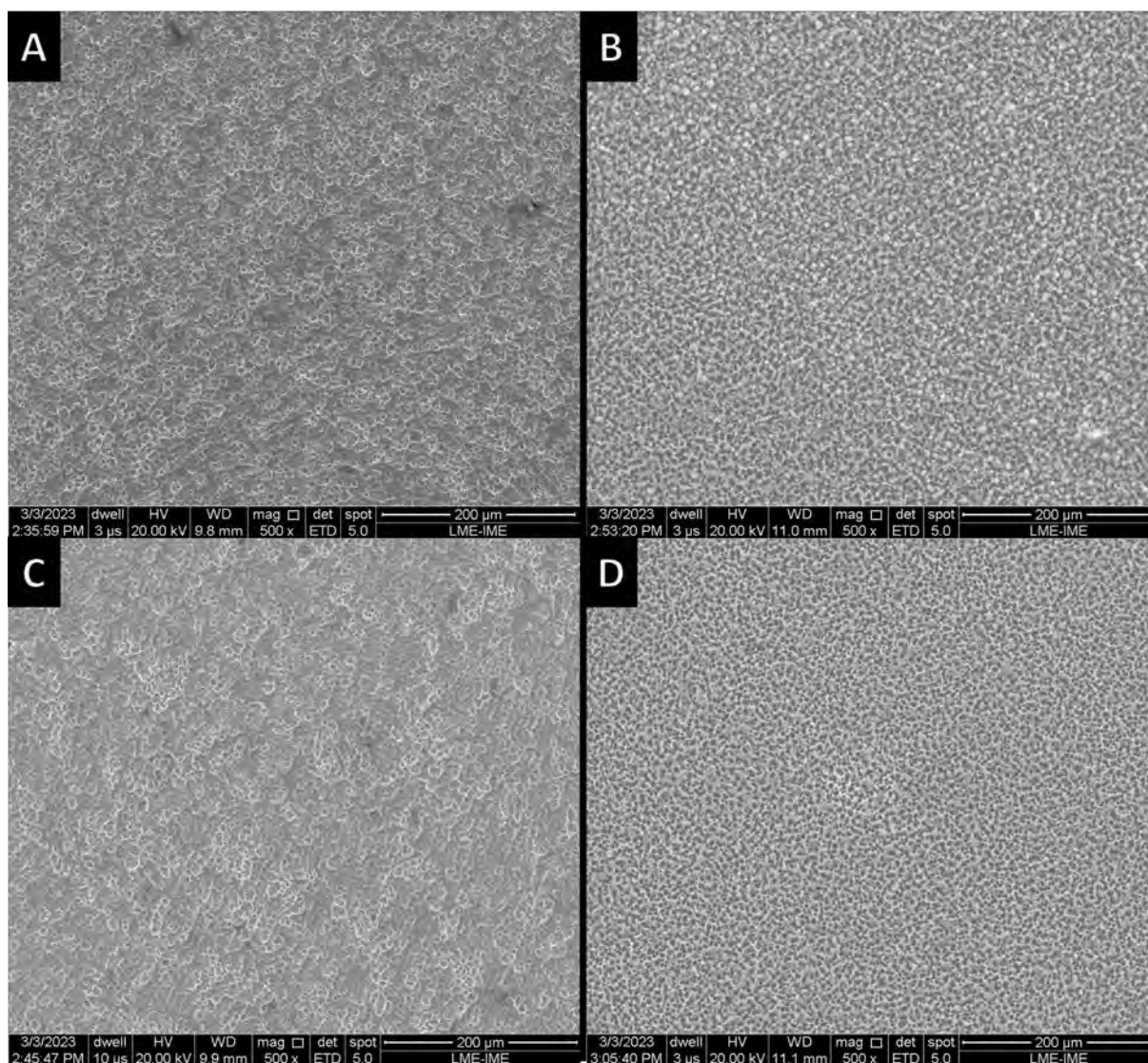


Figura 42 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 500X.

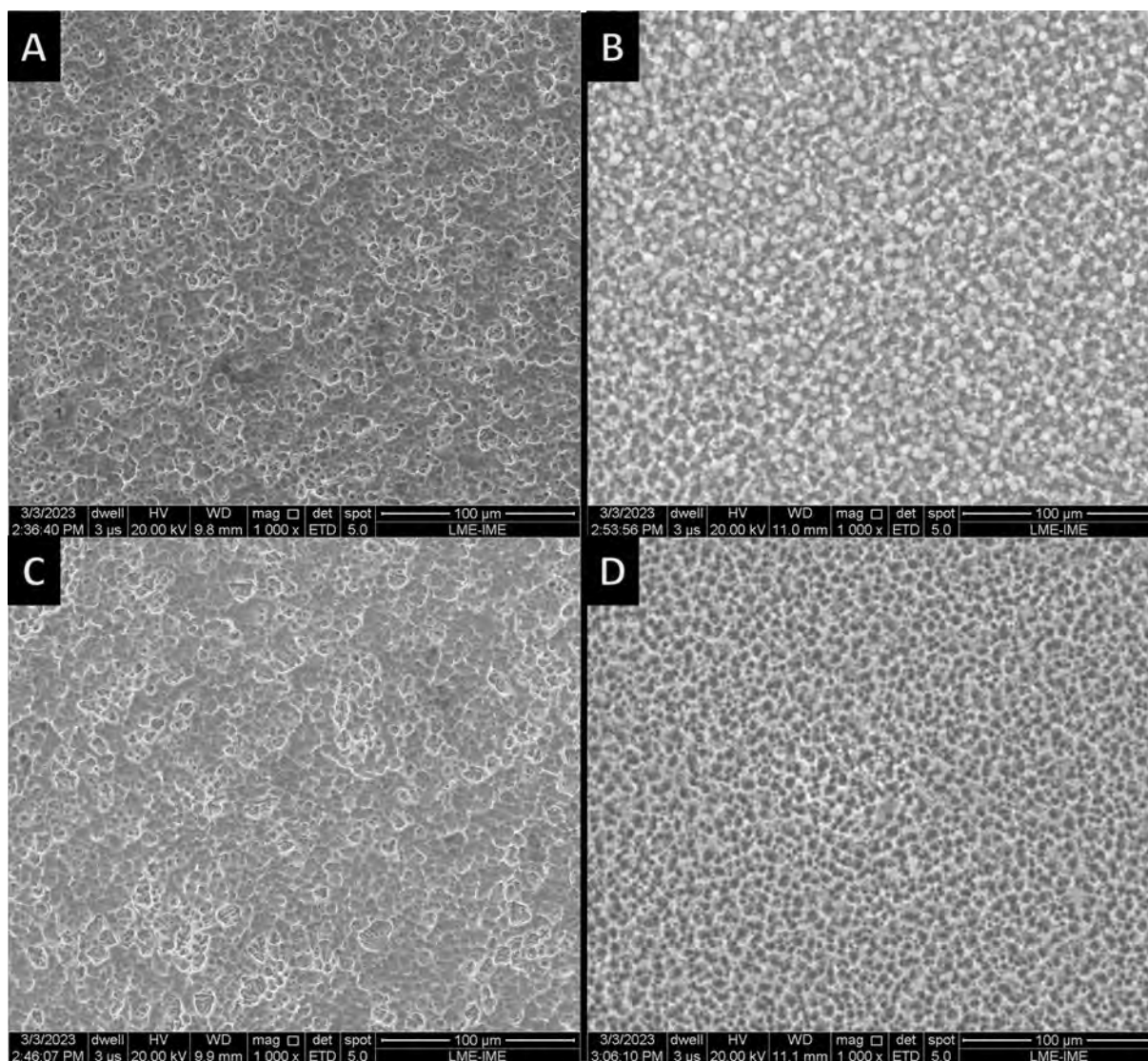


Figura 43 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 1000X.

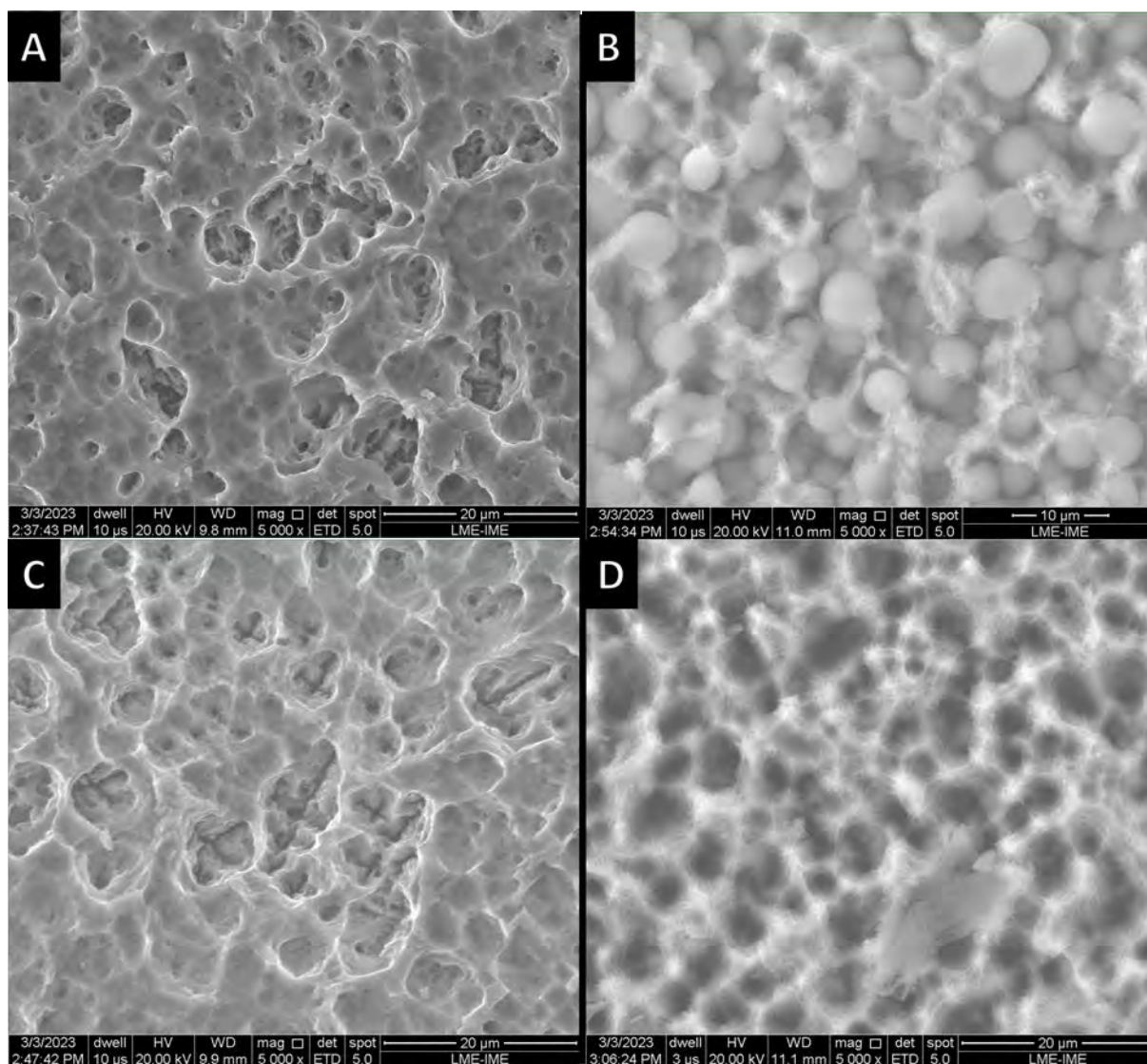


Figura 44 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 5000X.

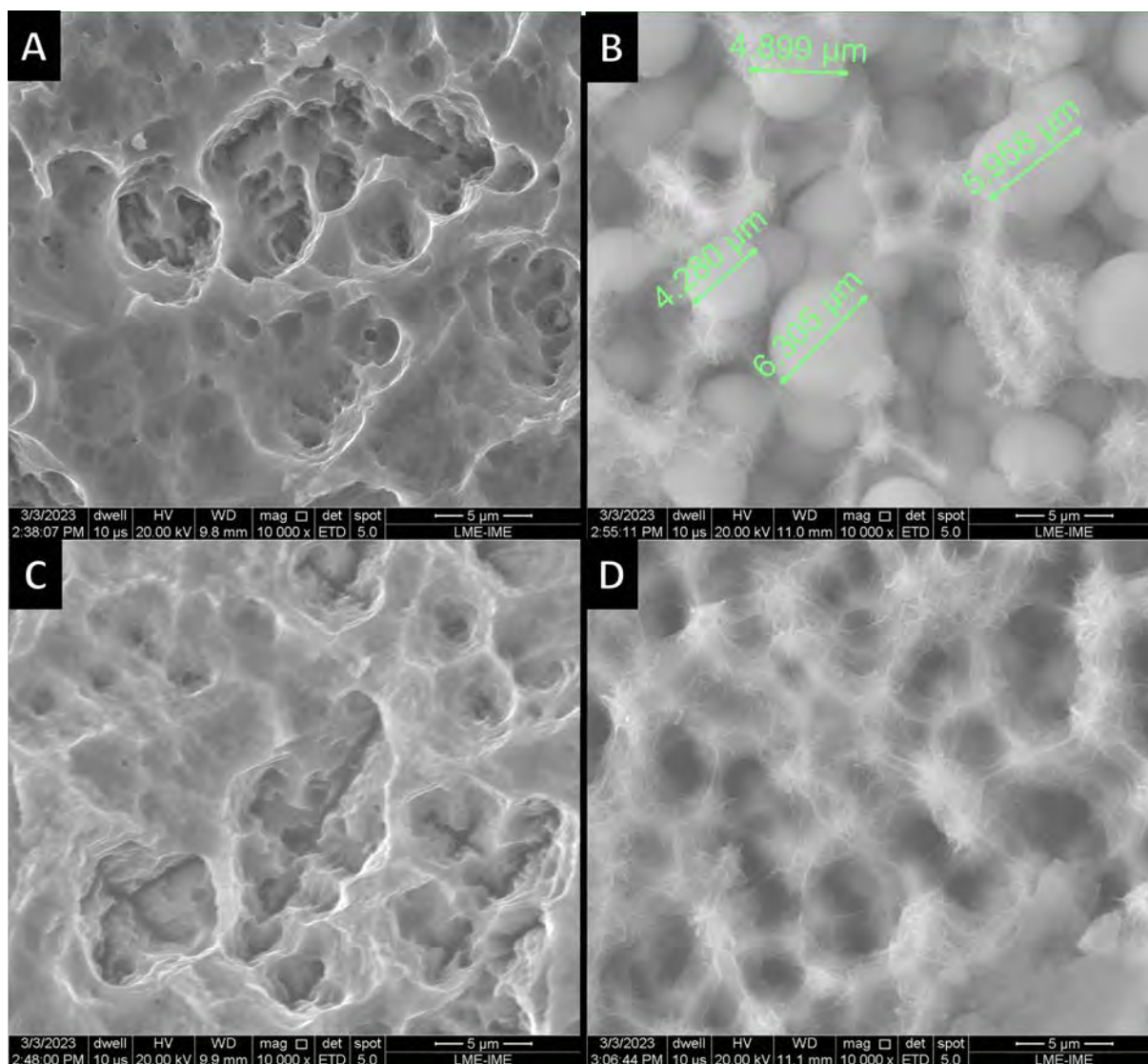


Figura 45 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 10000X.

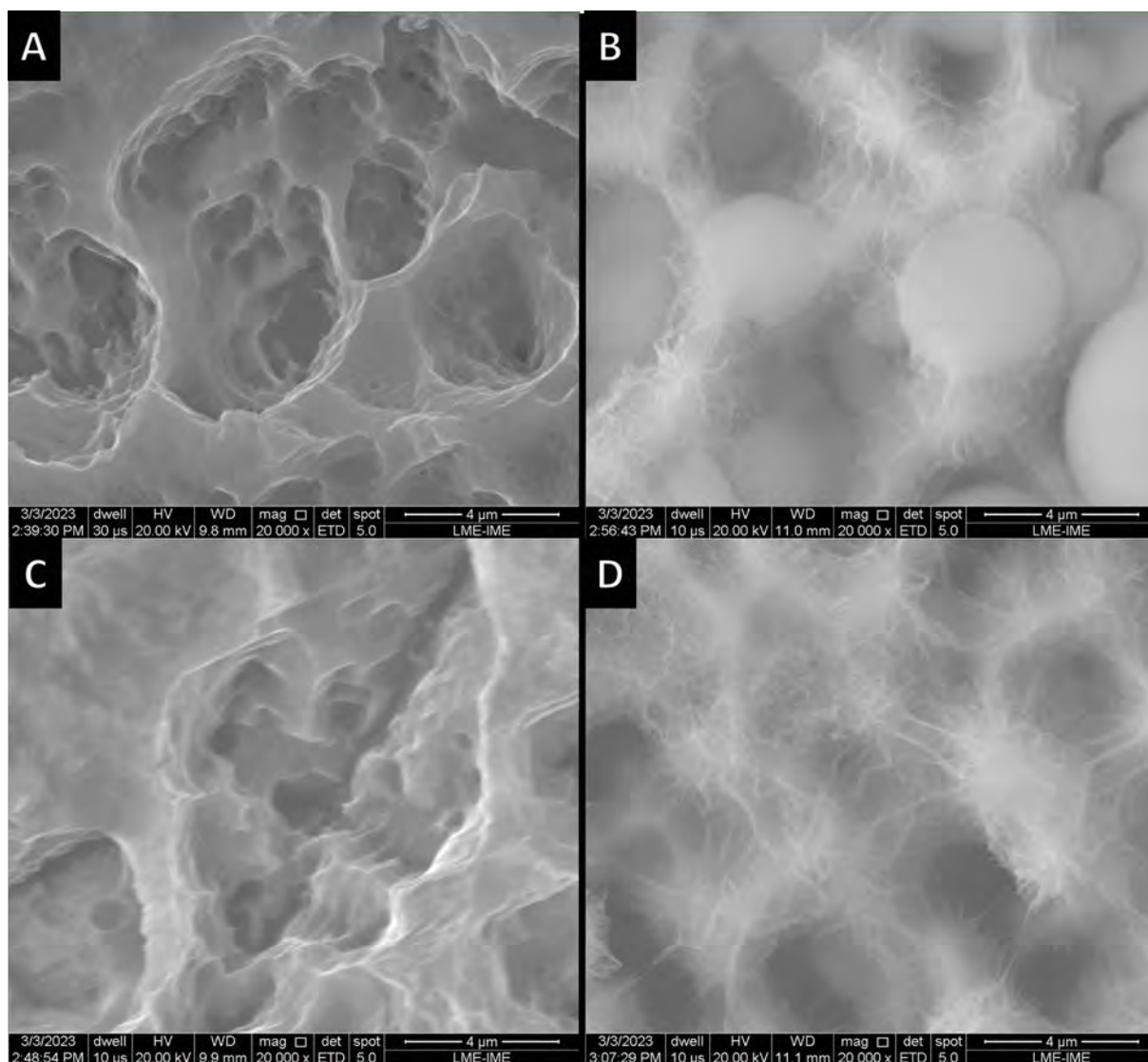


Figura 46 – Micrografia de MEV-FEG das superfícies das amostras dos grupos Ti (A), TiSi (B), TiP (C) e TiSiP (D) após 14 dias em Meio McCoy - 20000X.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que:

a. A imobilização do peptídeo pVTK em superfícies bioinertes de óxido de titânio não altera o comportamento dessa superfície em meio McCoy, enquanto a imobilização do pVTK em superfícies previamente bioativadas regula negativamente a fase inorgânica da mineralização, reduzindo a precipitação e a formação de aglomerados de apatita semelhante ao osso;

b. As modificações na superfície de titânio durante as etapas do processo preparação das amostras preservam os padrões de microrrugosidade e molhabilidade preconizados por diversos estudos experimentais sobre o impacto da topografia da superfície na resposta óssea, e estão em consonância com os tratamentos das superfícies de implantes comerciais;

c. A adsorção física e a ligação covalente pelo método de silanização são métodos eficazes para a incorporação do peptídeo pVTK a superfície do titânio;

d. O peptídeo pVTK não apresenta citotoxicidade quando incorporado à superfície de titânio;

e. O peptídeo pVTK regula negativamente a deposição de cálcio e fósforo em superfícies de titânio bioativas quando imersas em meio McCoy;

f. O peptídeo pVTK regula negativamente a precipitação e aglomeração de apatita semelhante ao osso em superfícies de titânio bioativas quando imersas em meio McCoy.

## 6 PERSPECTIVAS DE PESQUISA

Os resultados do estudo são fundamentais para o campo da engenharia biomédica, pois evidenciam a capacidade única do peptídeo pVTK de interagir com superfícies funcionalizadas e sequestrar íons cálcio, destacando-se como um mecanismo promissor para inibir a mineralização. Esta descoberta aponta para a necessidade de investigações futuras altamente técnicas e especializadas, focadas não apenas em compreender os mecanismos moleculares específicos que permitem essa bioatividade, mas também em aplicar esses conhecimentos para o design avançado de materiais biomédicos. A importância desses resultados reside na sua aplicação potencial para o desenvolvimento de novas terapias e materiais inovadores que podem ser utilizados em tratamentos *in vivo*, transformando radicalmente as estratégias atuais de regeneração tecidual e reparo ósseo. Este estudo, portanto, não apenas contribui significativamente para a base de conhecimento científico, mas também abre caminho para avanços tecnológicos cruciais na engenharia de materiais biomédicos

Algumas das perspectivas de pesquisa e trabalhos futuros incluem:

1. Estudos *In Vitro*: Recomenda-se a realização de novos estudos *in vitro*, nos quais o peptídeo pVTK seja utilizado para funcionalizar superfícies de titânio microrrugosas previamente revestidas com hidroxiapatita. A incorporação do pVTK a superfícies revestidas com esse material cerâmico pode estabelecer uma conexão com pesquisas anteriores que obtiveram resultados divergentes em relação ao presente estudo, uma vez que avaliaram a influência do pVTK na precipitação de apatita semelhante ao osso quando incorporado a cerâmicas bioativas em meio McCoy.

2. Testes com Células e Estudos *In Vivo*: Após a conclusão dos estudos *in vitro*, seria de extrema importância avançar para testes com células e estudos *in vivo* utilizando essas novas superfícies de titânio biofuncionalizadas, tanto com quanto sem o revestimento de hidroxiapatita. Isso permitiria avaliar a interferência desse peptídeo em diversas etapas da biomineralização em um contexto mais próximo do ambiente biológico real.

3. Análise das Interferências Moleculares: Além das avaliações de bioatividade, uma investigação mais detalhada das interações moleculares entre o peptídeo pVTK e as superfícies funcionalizadas é essencial. Isso incluiria a análise de enzimas e proteínas envolvidas na mineralização óssea, bem como os mecanismos subjacentes à inibição ou promoção da formação de apatita semelhante ao osso.

4. Aprimoramento de Biomateriais: Com base nos resultados dessas pesquisas, será possível aprimorar o design de biomateriais bioativos para aplicações em implantes biomédicos. Isso pode incluir a criação de materiais que sejam mais eficazes na promoção



da osseointegração ou na prevenção de calcificações patológicas.

Em resumo, essas perspectivas de pesquisa representam uma extensão natural do presente estudo e têm o potencial de fornecer percepções valiosas para o desenvolvimento futuro de biomateriais bioativos e sua aplicação prática em implantes biomédicos.

## REFERÊNCIAS

- 1 KAUR, M.; SINGH, K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 102, p. 844–862, 2019.
- 2 JEMAT, A.; GHAZALI, M. J.; RAZALI, M.; OTSUKA, Y. et al. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *BioMed research international*, Hindawi, v. 2015, 2015.
- 3 JAAFAR, A.; HECKER, C.; ÁRKI, P.; JOSEPH, Y. Sol-gel derived hydroxyapatite coatings for titanium implants: A review. *Bioengineering*, MDPI, v. 7, n. 4, p. 127, 2020.
- 4 HUANHUAN, J.; PENGJIE, H.; SHENG, X.; BINCHEN, W.; LI, S. The effect of strontium-loaded rough titanium surface on early osseointegration. *Journal of Biomaterials Applications*, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 32, n. 5, p. 561–569, 2017.
- 5 KANG, H.-G.; JEONG, Y.-S.; HUH, Y.-H.; PARK, C.-J.; CHO, L.-R. Impact of surface chemistry modifications on speed and strength of osseointegration. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 33, n. 4, 2018.
- 6 LUKASZEWSKA-KUSKA, M.; WIRSTLEIN, P.; MAJCHROWSKI, R.; DOROČKA-BOBKOWSKA, B. Osteoblastic cell behaviour on modified titanium surfaces. *Micron*, Elsevier, v. 105, p. 55–63, 2018.
- 7 SILVA, M. P. da. Osteoinductive biomaterials. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier, p. 1–5, 2016.
- 8 DOROZHUKIN, S. V. Calcium orthophosphates. *Journal of materials science*, Springer, v. 42, n. 4, p. 1061–1095, 2007.
- 9 LEE, J. J.; ROUHFAR, L.; BEIRNE, O. R. Survival of hydroxyapatite-coated implants: a meta-analytic review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Elsevier, v. 58, n. 12, p. 1372–1379, 2000.
- 10 XU, S.; XIAOYU, Y.; YUAN, S.; MINHUA, T.; JIAN, L.; AIDI, N.; XING, L. Morphology improvement of sandblasted and acid-etched titanium surface and osteoblast attachment promotion by hydroxyapatite coating. *Rare Metal Materials and Engineering*, Elsevier, v. 44, n. 1, p. 67–72, 2015.
- 11 HARUN, W.; ASRI, R.; ALIAS, J.; ZULKIFLI, F.; KADIRGAMA, K.; GHANI, S.; SHARIFFUDDIN, J. A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials. *Ceramics International*, Elsevier, v. 44, n. 2, p. 1250–1268, 2018.
- 12 FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; KIM, H.-M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials*, Elsevier, v. 25, n. 3, p. 443–450, 2004.
- 13 HENCH, L. L. The story of bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Springer, v. 17, n. 11, p. 967–978, 2006.

- 14 KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, Elsevier, v. 24, n. 13, p. 2161–2175, 2003.
- 15 KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M.; NAKAMURA, T. Review bioactive metals: preparation and properties. *Journal of Materials Science: materials in medicine*, Springer, v. 15, p. 99–107, 2004.
- 16 ZHAO, W.; XU, Z.; CUI, Q.; SAHAI, N. Predicting the structure–activity relationship of hydroxyapatite-binding peptides by enhanced-sampling molecular simulation. *Langmuir*, ACS Publications, v. 32, n. 27, p. 7009–7022, 2016.
- 17 LING, C.; ZHAO, W.; WANG, Z.; CHEN, J.; USTRIYANA, P.; GAO, M.; SAHAI, N. Structure–activity relationships of hydroxyapatite-binding peptides. *Langmuir*, ACS Publications, v. 36, n. 10, p. 2729–2739, 2020.
- 18 NASCIMENTO, M. do; ALMEIDA, A. R. dos S.; HIRATA, M. C.; ELZUBAIR, A.; ROCHA, D. N. da; SILVA, M. H. P. da. Biomineralization of calcium phosphates functionalized with hydroxyapatite-binding peptide. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Elsevier, v. 146, p. 106082, 2023.
- 19 ADDISON, W. N.; MILLER, S. J.; RAMASWAMY, J.; MANSOURI, A.; KOHN, D. H.; MCKEE, M. D. Phosphorylation-dependent mineral-type specificity for apatite-binding peptide sequences. *Biomaterials*, Elsevier, v. 31, n. 36, p. 9422–9430, 2010.
- 20 GUNGORMUS, M.; FONG, H.; KIM, I. W.; EVANS, J. S.; TAMERLER, C.; SARIKAYA, M. Regulation of in vitro calcium phosphate mineralization by combinatorially selected hydroxyapatite-binding peptides. *Biomacromolecules*, ACS Publications, v. 9, n. 3, p. 966–973, 2008.
- 21 RAMASWAMY, J.; NAM, H. K.; RAMARAJU, H.; HATCH, N. E.; KOHN, D. H. Inhibition of osteoblast mineralization by phosphorylated phage-derived apatite-specific peptide. *Biomaterials*, Elsevier, v. 73, p. 120–130, 2015.
- 22 HASHEMI, R. *Failure Analysis of Biometals*. [S.l.]: mdpi, 2020. 662 p.
- 23 KIM, J.; LEE, H.; JANG, T.-S.; KIM, D.; YOON, C.-B.; HAN, G.; KIM, H.-E.; JUNG, H.-D. Characterization of titanium surface modification strategies for osseointegration enhancement. *Metals*, MDPI, v. 11, n. 4, p. 618, 2021.
- 24 AZIZ-KERRZO, M.; CONROY, K. G.; FENELON, A. M.; FARRELL, S. T.; BRESLIN, C. B. Electrochemical studies on the stability and corrosion resistance of titanium-based implant materials. *Biomaterials*, Elsevier, v. 22, n. 12, p. 1531–1539, 2001.
- 25 KIM, M.-H.; PARK, K.; CHOI, K.-H.; KIM, S.-H.; KIM, S. E.; JEONG, C.-M.; HUH, J.-B. Cell adhesion and in vivo osseointegration of sandblasted/acid etched/anodized dental implants. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI, v. 16, n. 5, p. 10324–10336, 2015.
- 26 FERNANDES, D. J.; ELIAS, C. N.; VALIEV, R. Z. Properties and performance of ultrafine grained titanium for biomedical applications. *Materials Research*, SciELO Brasil, v. 18, p. 1163–1175, 2015.

- 27 HOTCHKISS, K. M.; REDDY, G. B.; HYZY, S. L.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D.; OLIVARES-NAVARRETE, R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta biomaterialia*, Elsevier, v. 31, p. 425–434, 2016.
- 28 LEITE, G. B.; FONSECA, Y. R.; GOMES, A. V.; ELIAS, C. N. Relação entre os parâmetros de rugosidade 3d e a molhabilidade do titânio com grãos micrométricos e sub-micrométricos. *Matéria (Rio de Janeiro)*, SciELO Brasil, v. 25, 2020.
- 29 WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research*, Wiley Online Library, v. 20, p. 172–184, 2009.
- 30 MATOS, G. R. M. Surface roughness of dental implant and osseointegration. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, Springer, v. 20, p. 1–4, 2021.
- 31 GUÉHENNEC, L. L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials*, Elsevier, v. 23, n. 7, p. 844–854, 2007.
- 32 LI, J.; ZHOU, P.; ATTARILAR, S.; SHI, H. Innovative surface modification procedures to achieve micro/nano-graded ti-based biomedical alloys and implants. *Coatings*, MDPI, v. 11, n. 6, p. 647, 2021.
- 33 HARAWAZA, K.; COUSINS, B.; ROACH, P.; FERNANDEZ, A. Modification of the surface nanotopography of implant devices: A translational perspective. *Materials Today Bio*, Elsevier, v. 12, p. 100152, 2021.
- 34 BENIASH, E. Biomaterials—hierarchical nanocomposites: the example of bone. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Wiley Online Library, v. 3, n. 1, p. 47–69, 2011.
- 35 SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience*, Wiley Online Library, v. 4, n. 8, p. 743–765, 2004.
- 36 MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews*, Oxford University Press, v. 21, n. 2, p. 115–137, 2000.
- 37 PALMER, L. C.; NEWCOMB, C. J.; KALTZ, S. R.; SPOERKE, E. D.; STUPP, S. I. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 108, n. 11, p. 4754–4783, 2008.
- 38 BROWN, W.; CHOW, L. Chemical properties of bone mineral. *Annual Review of Materials Science*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 6, n. 1, p. 213–236, 1976.
- 39 IJIMA, K.; HASHIZUME, M. Utilization of proteins and peptides to create organic-hydroxyapatite hybrids. *Protein and Peptide Letters*, Bentham Science Publishers, v. 25, n. 1, p. 25–33, 2018.
- 40 MANN, S. Biomaterialization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry. Oxford University Press, 2001.

- 41 GANSS, B.; KIM, R. H.; SODEK, J. Bone sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, International and American Associations for Dental Research, v. 10, n. 1, p. 79–98, 1999.
- 42 BIANCO, P.; FISHER, L. W.; YOUNG, M. F.; TERMINE, J. D.; ROBEY, P. G. Expression of bone sialoprotein (bsp) in developing human tissues. *Calcified tissue international*, Springer, v. 49, p. 421–426, 1991.
- 43 GERICKE, A.; QIN, C.; SPEVAK, L.; FUJIMOTO, Y.; BUTLER, W.; SØRENSEN, E.; BOSKEY, A. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcified tissue international*, Springer, v. 77, p. 45–54, 2005.
- 44 WEINREB, M.; SHINAR, D.; RODAN, G. A. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *Journal of Bone and Mineral Research*, Wiley Online Library, v. 5, n. 8, p. 831–842, 1990.
- 45 DUCY, P.; DESBOIS, C.; BOYCE, B.; PINERO, G.; STORY, B.; DUNSTAN, C.; SMITH, E.; BONADIO, J.; GOLDSTEIN, S.; GUNDBERG, C. et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 382, n. 6590, p. 448–452, 1996.
- 46 MARQUIS, M.-E.; LORD, E.; BERGERON, E.; DREVELLE, O.; PARK, H.; CABANA, F.; SENTA, H.; FAUCHEUX, N. Bone cells-biomaterials interactions. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, IMR Press, v. 14, n. 3, p. 1023–1067, 2009.
- 47 TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 289, n. 5484, p. 1504–1508, 2000.
- 48 VÄÄNÄNEN, H. K.; ZHAO, H.; MULARI, M.; HALLEEN, J. M. The cell biology of osteoclast function. *Journal of cell science*, The Company of Biologists Ltd, v. 113, n. 3, p. 377–381, 2000.
- 49 SHARMA, V.; SRINIVASAN, A.; ROYCHOUDHURY, A.; RANI, K.; TYAGI, M.; DEV, K.; NIKOLAJEFF, F.; KUMAR, S. Characterization of protein extracts from different types of human teeth and insight in biomineralization. *Scientific reports*, Nature Publishing Group UK London, v. 9, n. 1, p. 9314, 2019.
- 50 SHARMA, V.; SRINIVASAN, A.; NIKOLAJEFF, F.; KUMAR, S. Biomineralization process in hard tissues: The interaction complexity within protein and inorganic counterparts. *Acta biomaterialia*, Elsevier, v. 120, p. 20–37, 2021.
- 51 YOREO, J. J. D.; GILBERT, P. U.; SOMMERDIJK, N. A.; PENN, R. L.; WHITE-LAM, S.; JOESTER, D.; ZHANG, H.; RIMER, J. D.; NAVROTSKY, A.; BANFIELD, J. F. et al. Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 349, n. 6247, p. aaa6760, 2015.
- 52 HENCH, L. L.; SPLINTER, R. J.; ALLEN, W.; GREENLEE, T. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of biomedical materials research*, Wiley Online Library, v. 5, n. 6, p. 117–141, 1971.

- 53 HENCH, L.; JR, C. P.; BUSCEMI, P.; GREENSPAN, D. Analysis of bioglass fixation of hip prostheses. *Journal of biomedical materials research*, Wiley Online Library, v. 11, n. 2, p. 267–282, 1977.
- 54 KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, Elsevier, v. 12, n. 2, p. 155–163, 1991.
- 55 OYANE, A.; KIM, H.-M.; FURUYA, T.; KOKUBO, T.; MIYAZAKI, T.; NAKAMURA, T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, Wiley Online Library, v. 65, n. 2, p. 188–195, 2003.
- 56 TAKADAMA, H.; HASHIMOTO, M.; MIZUNO, M.; KOKUBO, T. Round-robin test of sbf for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. *Phosphorus Research Bulletin*, Japanese Association of Inorganic Phosphorus Chemistry, v. 17, p. 119–125, 2004.
- 57 ISO23317. Implants for surgery-in vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. *Int. Stand.*, 2007.
- 58 FARAG, M. M. Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications. *Journal of Materials Science*, Springer, v. 58, n. 2, p. 527–558, 2023.
- 59 COLE, B. J.; BOSTROM, M. P.; PRITCHARD, T. L.; SUMNER, D. R.; TOMIN, E.; LANE, J. M.; WEILAND, A. J. Use of bone morphogenetic protein 2 on ectopic porous coated implants in the rat. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, LWW, v. 345, p. 219–228, 1997.
- 60 KIM, H.; MIYAJI, F.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Effect of heat treatment on apatite-forming ability of ti metal induced by alkali treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Springer, v. 8, p. 341–347, 1997.
- 61 NISHIGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; KOBAYASHI, M.; KIM, H.-M.; MIYAJI, F.; KOKUBO, T. The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali-treated titanium. *Biomaterials*, Elsevier, v. 20, n. 5, p. 491–500, 1999.
- 62 LEE, B.-H.; KIM, Y. D.; SHIN, J. H.; LEE, K. H. Surface modification by alkali and heat treatments in titanium alloys. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, Wiley Online Library, v. 61, n. 3, p. 466–473, 2002.
- 63 HERSEL, U.; DAHMEN, C.; KESSLER, H. Rgd modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, Elsevier, v. 24, n. 24, p. 4385–4415, 2003.
- 64 SEGVICH, S.; BISWAS, S.; BECKER, U.; KOHN, D. H. Identification of peptides with targeted adhesion to bone-like mineral via phage display and computational modeling. *Cells Tissues Organs*, S. Karger AG Basel, Switzerland, v. 189, n. 1-4, p. 245–251, 2008.
- 65 SEGVICH, S. J.; SMITH, H. C.; KOHN, D. H. The adsorption of preferential binding peptides to apatite-based materials. *Biomaterials*, Elsevier, v. 30, n. 7, p. 1287–1298, 2009.

- 66 FLADE, K.; LAU, C.; MERTIG, M.; POMPE, W. Osteocalcin-controlled dissolution-precipitation of calcium phosphate under biomimetic conditions. *Chemistry of materials*, ACS Publications, v. 13, n. 10, p. 3596–3602, 2001.
- 67 SÁNCHEZ-BODÓN, J.; OLMO, J. Andrade del; ALONSO, J. M.; MORENO-BENÍTEZ, I.; VILAS-VILELA, J. L.; PÉREZ-ÁLVAREZ, L. Bioactive coatings on titanium: a review on hydroxylation, self-assembled monolayers (sams) and surface modification strategies. *Polymers*, MDPI, v. 14, n. 1, p. 165, 2021.
- 68 GODOY, M.; SEVILLA, P.; GIL, F.; RODRIGUEZ, D. Unión de péptidos a superficies de titanio para la mejora de la osteointegración. *Biomecánica*, SIIB, v. 17, n. 2, p. 60–68, 2009.
- 69 HOLMBERG, K. V.; ABDOLHOSSEINI, M.; LI, Y.; CHEN, X.; GORR, S.-U.; APARICIO, C. Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications. *Acta biomaterialia*, Elsevier, v. 9, n. 9, p. 8224–8231, 2013.
- 70 TEIXEIRA, G. T. L.; NASCIMENTO, J. P. L. do; GELAMO, R. V.; MORETO, J. A.; SLADE, N. B. L. Strategies for functionalization of metallic surfaces with bioactive peptides: a mini review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, Springer, v. 29, n. 2, p. 24, 2023.
- 71 GODOY-GALLARDO, M.; MAS-MORUNO, C.; YU, K.; MANERO, J. M.; GIL, F. J.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; RODRIGUEZ, D. Antibacterial properties of hlf1–11 peptide onto titanium surfaces: A comparison study between silanization and surface initiated polymerization. *Biomacromolecules*, ACS Publications, v. 16, n. 2, p. 483–496, 2015.
- 72 ÁLVAREZ-LÓPEZ, A.; COLCHERO, L.; ELICES, M.; GUINEA, G. V.; PÉREZ-RIGUEIRO, J.; GONZÁLEZ-NIETO, D. Improved cell adhesion to activated vapor silanization-biofunctionalized ti-6al-4v surfaces with ecm-derived oligopeptides. *Biomaterials Advances*, Elsevier, v. 133, p. 112614, 2022.
- 73 XIAO, S.-J.; TEXTOR, M.; SPENCER, N. D.; SIGRIST, H. Covalent attachment of cell-adhesive,(arg-gly-asp)-containing peptides to titanium surfaces. *Langmuir*, ACS Publications, v. 14, n. 19, p. 5507–5516, 1998.
- 74 SEVILLA, P.; GIL, J.; APARICIO, C. Relevant properties for immobilizing short peptides on biosurfaces. *Irbm*, Elsevier, v. 38, n. 5, p. 256–265, 2017.
- 75 ELIAS, C. N.; OSHIDA, Y.; LIMA, J. H. C.; MULLER, C. A. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, Elsevier, v. 1, n. 3, p. 234–242, 2008.
- 76 PONSONNET, L.; REYBIER, K.; JAFFREZIC, N.; COMTE, V.; LAGNEAU, C.; LISSAC, M.; MARTELET, C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 23, n. 4, p. 551–560, 2003.
- 77 VANITHAKUMARI, S.; GEORGE, R.; MUDALI, U. K. Influence of silanes on the wettability of anodized titanium. *Applied surface science*, Elsevier, v. 292, p. 650–657, 2014.

- 78 LAZARO, G. S.; SANTOS, S. C.; ALMEIDA, L. E.; BARRETO, L. S.; SANTOS, E. Araujo dos. The equilibrium between calcite and apatite precipitation onto bioglass from three different aqueous media. *Key Engineering Materials*, Trans Tech Publ, v. 493, p. 102–107, 2012.
- 79 MARÇAL, R. L. S. B.; FERREIRA, J. R. M.; LOURO, L. H. L.; COSTA, A. M.; ROCHA, D. Navarro da; CAMPOS, J. B. de; SILVA, M. H. Prado da. Apatite coatings from ostrich eggshell and its bioactivity assessment. *Key Engineering Materials*, Trans Tech Publ, v. 720, p. 185–188, 2017.
- 80 ROCHA, D. N. da; CRUZ, L. R. de O.; CAMPOS, J. B. de; MARÇAL, R. L. S. B.; MIJARES, D. Q.; COELHO, P. G.; SILVA, M. H. P. da. Mg substituted apatite coating from alkali conversion of acidic calcium phosphate. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 70, p. 408–417, 2017.
- 81 ROCHA, D. N. da; CRUZ, L. R. de O.; CAMPOS, J. B. de; SANTOS, J. L. dos; MARÇAL, R. L. S. B.; MIJARES, D. Q.; BARBOSA, R. M.; COELHO, P. G.; SILVA, M. H. P. da. Bioactivity of strontium-monetite coatings for biomedical applications. *Ceramics International*, Elsevier, v. 45, n. 6, p. 7568–7579, 2019.
- 82 SILVA, H. M. D.; MATEESCU, M.; PONCHE, A.; DAMIA, C.; CHAMPION, E.; SOARES, G.; ANSELME, K. Surface transformation of silicon-doped hydroxyapatite immersed in culture medium under dynamic and static conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 75, n. 1, p. 349–355, 2010.
- 83 CHEN, X.; ZHU, R.-f.; GAO, H.; XU, W.-l.; XIAO, G.-y.; CHEN, C.-z.; LU, Y.-p. A high bioactive alkali-treated titanium surface induced by induction heat treatment. *Surface and Coatings Technology*, Elsevier, v. 385, p. 125362, 2020.
- 84 TUGULU, S.; LÖWE, K.; SCHARNWEBER, D.; SCHLOTTIG, F. Preparation of superhydrophilic microrough titanium implant surfaces by alkali treatment. *Journal of materials science: Materials in medicine*, Springer, v. 21, p. 2751–2763, 2010.
- 85 DRELICH, J.; CHIBOWSKI, E. Superhydrophilic and superwetting surfaces: definition and mechanisms of control. *Langmuir*, ACS Publications, v. 26, n. 24, p. 18621–18623, 2010.
- 86 NALBAND, D. M.; WARNER, B. P.; ZAHLER, N. H.; KIRSHENBAUM, K. Rapid identification of metal-binding peptoid oligomers by on-resin x-ray fluorescence screening. *Peptide Science*, Wiley Online Library, v. 102, n. 5, p. 407–415, 2014.
- 87 SHAFIEE, M. A. M.; ASRI, M. A. M.; ALWI, S. S. S. Review on the in vitro cytotoxicity assessment in accordance to the international organization for standardization (iso). *Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences*, v. 17, n. 2, 2021.
- 88 ISO-10993-5. . biological compatibility of medical devices- part 5. tests for cytotoxicity: In vitro methods. *Int. Stand.*, 2009.
- 89 VINKEN, M.; BLAAUBOER, B. J. In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. *Toxicology in vitro*, Elsevier, v. 39, p. 104–110, 2017.



- 90 LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical reports*, Spandidos Publications, v. 3, n. 5, p. 617–620, 2015.
- 91 TONED, A.; JOUBERT, A.; CROMARTY, D. Limitation of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2h-tetrazolium bromide (mtt) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res. Notes*, v. 8, p. 47, 2015.
- 92 JONÁŠOVÁ, L.; MÜLLER, F. A.; HELEBRANT, A.; STRNAD, J.; GREIL, P. Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium. *Biomaterials*, Elsevier, v. 25, n. 7-8, p. 1187–1194, 2004.
- 93 KIM, H.-M.; HIMENO, T.; KAWASHITA, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment. *Journal of the Royal Society Interface*, The Royal Society, v. 1, n. 1, p. 17–22, 2004.
- 94 MCGOLDRICK, S. J.; PAN, H.; MISHINA, Y.; KOHN, D. H. Mineral-binding peptide reduces effect of ectopic mineralization.