



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LETÍCIA MORO BINS ELY

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO
EM MEIO FISIOLÓGICO SIMULADO**

FLORIANÓPOLIS

2015

Letícia Moro Bins Ely

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO EM
MEIO FISIOLÓGICO SIMULADO

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ely, Letícia Moro Bins

Estimulação Elétrica de Superfícies de Titânio em Meio Fisiológico Simulado ; Letícia Moro Bins Ely ; orientador, Ricardo de Souza Magini – Florianópolis, SC, 2015.

117 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Inclui Referências

1. Odontologia. 2. Estimulação por corrente contínua. 3. Corrosão. 4. Titânio. 5. Eletroquímica. I. Magini, Ricardo de Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Letícia Moro Bins Ely

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO EM
MEIO FISIOLÓGICO SIMULADO

Florianópolis, 10 de Fevereiro de 2015.

Prof. Dr.^a Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do curso
Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Julio C. M. Souza,
Membro/UFSC

Prof. Dr. Almir Spinelli,
Membro/UFSC

Prof. Dr. Luismar Marques Porto,
Membro/UFSC

Prof. Dr. César A. M. Benfa
Suplente/UFSC

Às pessoas que amo...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser a razão de tudo.

À minha família, pelo exemplo de vida, amor e carinho.

Aos meus pais, Jorge e Vera Helena, pelo incentivo à vida acadêmica e, sobretudo, por me ensinarem a sonhar, a acreditar e a buscar.

Ao Luis Paulo, por ser paciente, companheiro, amigo e carinhoso nesse momento da minha vida. Obrigada a toda sua família pelo apoio.

À Helena Maria de Araújo, por acreditar no meu potencial. Sua dedicação à Odontologia fez eu me apaixonar por esta profissão.

Aos amigos que conquistei durante a vida, especialmente àqueles que me apoiaram nessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini, pela orientação e colaboração para o meu desenvolvimento profissional. Seu amor à vida acadêmica é fonte de inspiração e motivação.

Ao Prof. Dr. Julio Souza, pela confiança, disponibilidade e apoio para realização desse trabalho.

Aos professores Luismar Porto e Almir Spinelli, por disponibilizarem seus laboratórios para realização dos experimentos.

Aos amigos Karina Cesca e Fernando de Souza, pelos conhecimentos transmitidos e experimentos realizados. Sem vocês este trabalho não existiria.

À Prof. Marta Elisa Rosso, pela atenção, disponibilidade e motivação.

À Cláudia Merlini, pelas análises das amostras e discussão dos resultados.

Aos professores do CEPID: César Benfatti, Antônio Carlos Cardoso, Marco Aurélio Bianchini, Cláudia Volpato, pelos ensinamentos e experiências transmitidos.

Aos colegas do curso de Mestrado, Carolina, Gabriella, Juan, Abraão e Maurício, pelo apoio e amizade.

Aos colegas do CEPID, Thaíse, Débora, Bruna, Patrícia, Gabriel, Felipe, Daniel, Miguel, Jair, Gil, Artur, Bernardo, Juliana, Haline, Mariela, Caroline, José, Camilo, Cíntia, Ísis e Maria. Em especial ao Cléssius, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos Laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina: Intelab, CERMAT, LABMAT, LCME, LOOSA e GEPPEA. Em especial ao Rafael e aos colegas do Intelab, pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos funcionários da UFSC, especialmente à Silvane, pela dedicação e colaboração.

Aos pacientes, pela confiança e paciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e à UFSC, ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

*“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Chaplin*

RESUMO

O tempo de integração óssea de implantes de titânio é reportado na literatura como sendo de 12 semanas em maxila e 6 semanas em mandíbula, aproximadamente. Novas técnicas e superfícies de implante têm sido desenvolvidas para acelerar a formação óssea e, conseqüentemente, diminuir o tempo de osseointegração. Um método alternativo aplicado em superfícies de implantes é baseado em estimulação elétrica. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da estimulação elétrica em superfície de titânio imersa em um meio fisiológico simulado. Discos de titânio comercialmente puro grau IV e liga de Ti6Al4V com dimensões de 8 por 15 mm foram polidos com lixas d'água de granulometrias decrescentes até 2500 e, posteriormente, polidas com feltro e alumina (1,0 μm ; 0,5 μm e 0,3 μm). As amostras foram limpas com álcool 70% e com água destilada durante 10 minutos sob vibração ultra-sônica. Após esterilizadas, as amostras foram conectadas a um potenciostato, que induziu e monitorou corrente elétrica direta e constante sobre a superfície. As amostras de titânio foram inseridas em uma célula eletrolítica contendo meio eletrolítico e divididas em 2 grupos: Ti-CP e Ti6Al4V e cada grupo subdividido conforme a aplicação de corrente elétrica e meio eletrolítico: C1 (0 μA sem meio); C2 (0 μA imersas em DMEM e soro fetal bovino); 5 μA e 10 μA (imersas em DMEM e soro fetal bovino). Após estimulação elétrica, avaliou-se a adsorção de proteínas por testes quantitativos de Lowry e FTIR. As superfícies de titânio foram caracterizadas por testes eletroquímicos de potencial de circuito aberto e impedância e por análise topográfica a partir de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A partir das análises por FTIR, observou-se a presença de bandas de energia características de amida em todas as amostras submersas em solução fisiológica indicando a presença de proteínas. Pelo método de Lowry a maior quantidade de proteína total adsorvida ocorreu nos subgrupos C2 ($p < 0,05$). Quanto às alterações morfológicas, o teste de perfilometria indicou maiores valores de Ra para as amostras de titânio puro submetidas a 10 μA ($p < 0,05$). As superfícies de Ti6Al4V apresentaram os maiores valores de Ra para 5 μA , mas sem diferença estatística com o subgrupo 10 μA ($p > 0,05$). As imagens do MEV não revelaram diferenças entre os grupos. Quando submetidas aos testes eletroquímicos, as amostras testes (5 μA e 10 μA) apresentaram maior resistência à corrosão. Foram encontradas alterações eletroquímicas e topográficas em superfície de Ti-CP e Ti6Al4V após estimulação elétrica em meio fisiológico simulado.

Palavras-chave: Estimulação por corrente contínua, Corrosão, Titânio, Eletroquímica.

ABSTRACT

The required time for a titanium implant to become functional is reported in the literature as 12 weeks in maxilla and 6 weeks in mandible, approximately. New techniques and implant surfaces have been developed for accelerating bone formation and consequently reduce osseointegration time. An alternative method applied on implants surfaces is based on electrical stimulation. The aim of this study was to evaluate the electrical stimulation influence on titanium surface immersed in a physiological simulated environment. Commercially pure titanium grade IV and Ti6Al4V alloy with dimensions of 8 x 15 mm were wet ground on SiC abrasive papers down to 2500 Mesh and polished with alumina (1.0; 0.5 and 0.3 μm). After grinding, the samples were cleaned with 70% ethanol and distilled water for 10 minutes under ultrasonic bath. After sterilized, the samples were connected to a potentiostat, which induced and monitored direct and constant electric current on the surface. The titanium samples were placed in an electrolytic cell containing electrolyte medium and divided into 2 groups: Ti-CP and Ti6Al4V, further divided according to electric current application and electrolyte means: C1 (0 μA without medium); C2 (0 μA immersed in DMEM and FBS); 5 μA to 10 μA (immersed in DMEM and FBS). After electrical stimulation, proteins adsorption was quantitative evaluated by Lowry and FTIR tests. Titanium surfaces were characterized by open circuit potential, impedance and topographic analysis from atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). FTIR analysis, showed the presence of amide energy bands characteristic in all samples immersed in DMEM + FBS indicating the presence of proteins. By the Lowry method the greatest amount of total protein adsorbed was C2 subgroups ($p < 0.05$). Regarding morphological change, the profilometry testing showed higher Ra values for pure titanium samples submitted to 10 μA ($p < 0.05$). Ti6Al4V surfaces had the highest Ra values for 5 μA , but no statistical difference with subgroup 10 μA ($p > 0.05$). SEM images revealed no differences between the groups. When submitted to electrochemical tests, test samples (5 μA and 10 μA) showed greater corrosion resistance. Was found electrochemical and topographical changes in Ti-CP and Ti6Al4V surfaces after electrical stimulation in physiological simulated environment.

Keywords: Direct current stimulation, Corrosion, Titanium, Electrochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração de proteína total adsorvida sobre as superfícies de Ti6Al4V e Ti-CP: C (controle na presença de meio) 5 μ A e 10 μ A.	47
Figura 2. Espectros obtidos por ATR-FTIR das amostras de Ti-CP após imersão nos meios fisiológicos simulados (DMEM e soro fetal bovino): grupo controle (C2); aplicação de estímulo elétrico (5 μ A e 10 μ A).....	48
Figura 3. Espectros obtidos por ATR-FTIR das amostras de Ti6Al4V após imersão nos meios fisiológicos simulados (DMEM e FBS): grupo controle (C2); aplicação de estímulo elétrico (5 μ A e 10 μ A).....	48
Figura 4. Imagem obtida por MEV mostrando a topografia da superfície dos discos de Ti-CP após imersão no meio fisiológico e estimulação elétrica. (A) C2 – controle com meio, (B) 5 μ A e (C) 10 μ A. Método de elétrons secundários, ampliação original de 2,000 X e voltagem de 15 kV.....	49
Figura 5. Imagem obtida por MEV mostrando a topografia da superfície dos discos de Ti6Al4V após imersão no meio fisiológico e estimulação elétrica. (A) C2 – controle com meio, (B) 5 μ A e (C) 10 μ A. Método de elétrons secundários, ampliação original de 500 X e voltagem de 15 kV.....	50
Figura 6. Valores da rugosidade média (R_a) das superfícies de Ti6Al4V e Ti-CP após imersão em solução fisiológica simulada e aplicação de corrente elétrica. C1 –controle sem meio; C2 – controle com meio; estimulação elétrica em 5 μ A e 10 μ A.	50
Figura 7. Valores da rugosidade em parâmetro R_t das superfícies de Ti6Al4V e Ti-CP após imersão em solução fisiológica simulada e aplicação de corrente elétrica. C1 –controle sem meio; C2 – controle com meio; estimulação elétrica em 5 μ A e 10 μ A.....	51
Figura 8. Imagens do AFM mostram a topografia da superfície dos discos de Ti-CP: (A) C1; (B) C2; (C) 5 μ A e (D) 10 μ A.....	53
Figura 9. Imagens do AFM mostram a topografia da superfície dos discos de Ti6Al4V: (A) C1; (B) C2; (C) 5 μ A e (D) 10 μ A.....	54
Figura 10. OCP: (a) Ti-CP (b) Ti6Al4V para: ■ C1 (PBS), □ C2 (DMEM + FBS), ▲ 5 μ A e △ 10 μ A.....	56
Figura 11. Diagrama de Nyquist: ■ Controle Ti-CP e ○ Controle Ti6Al4V.....	57

Figura 12. Gráficos de Impedância total vs. Frequência. ■Ti-CP e ○ Ti6Al4V.....	58
Figura 13. Gráficos de Ângulo de fase vs. Frequência ■Ti-CP e ○ Ti6Al4V.....	59
Figura 14. Células eletrolítica preparada para ensaio de CP.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de rugosidade RMS e R_a para Ti-CP e Ti6Al4V.....	55
Tabela 2. Valores de OCP, resistência à polarização e capacitância das superfícies de Ti-CP e Ti6Al4V após imersão em solução fisiológica simulada e aplicação de corrente elétrica. C1 – controle sem meio; C2 – controle com meio; estimulação elétrica em 5 μ A e 10 μ A.....	60

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ti-CP	Titânio puro
Ti6Al4V	Liga titânio alumínio – vanádio
C1	Controle 1 = 0 μA – na ausência de meio
C2	Controle 2 = 0 μA – em DMEM + FBS
PDGF	Fatores de crescimento derivado de plaquetas
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
°C	Graus Celsius
g cm ⁻³	Gramas por centímetro cúbico
OH	Radical hidroxila
HCl	Ácido clorídrico
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia
CD	Corrente direta
EI	Estímulo indutivo
EC	Estímulo capacitivo
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
RMV	Raiz do valor quadrático médio
AFM	Microscopia de Força Atômica
R _a	Rugosidade média
R _t	Rugosidade máxima total
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
FBS	Soro Fetal Bovino
PBS	Tampão fosfato salino
ATR	Modo de refletância total atenuada
OCP	Potencial de Circuito Aberto
BSA	Albumina do soro bovino
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
O	Oxigênio
C _{dl}	Capacitância da dupla camada elétrica
C	Carbono
Na	Sódio
Al	Alumínio
Cl	Cloro
P	Potássio
V	Vanádio
Au	Ouro
nm	Nanometros
TiO ₂	Dióxido de titânio

H	Hidrogênio
N	Nitrogênio
log	Logaritmo de base 10
f	Frequência
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
pH	Potencial hidrogeniônico
CP	Cronopotenciometria
KCl	Cloreto de potássio
mg	Miligramas
mL	Mililitro
h	Horas
μ L	Microlitro
min	Minutos
mm	Milímetro
μ m	Micrometro
ET	Eletrodo de trabalho
EA	Eletrodo auxiliar
ER	Eletrodo de referência
Ag/AgCl(KCl _{sat})	Prata/cloreto de prata
KCl _{sat}	Cloreto de potássio saturado
kHz	KiloHertz
mHz	MiliHertz
mV	Milivolts
μ Fcm ⁻²	Microfarads por centímetro quadrado
k Ω cm ²	KiloOhm por centímetro quadrado
cm ⁻¹	Centímetros
kV	Kilovolts
μ A	Microampères
R _p	Resistência à polarização
Z _{re}	Impedância real
Z _{im}	Impedância imaginária (número complexo)
Hz	Hertz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 PERGUNTAS DE PESQUISA	33
2.1 PERGUNTA PRINCIPAL.....	33
2.2 PERGUNTAS SECUNDÁRIAS	33
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5 ARTIGO EM PORTUGUÊS	39
5.1 RESUMO.....	39
5.2 INTRODUÇÃO	40
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.3.1 <i>Preparação das amostras</i>	43
5.3.2 <i>Aplicação de corrente elétrica (ensaio Galvanostático)</i>	43
5.3.3 <i>Análise da adsorção de proteínas</i>	44
5.3.3.1 Determinação das proteínas totais por teste colorimétrico	44
5.3.3.2 Análise quantitativa, em tempo real, FT-IR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)	44
5.3.4 <i>Análise da superfície de titânio</i>	45
5.3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
5.3.4.2 Perfilometria	45
5.3.4.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)	46
6.3.4.4 Potencial de Circuito Aberto (OCP) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)	46
5.3.5 <i>Análise estatística</i>	46
5.4 RESULTADOS	46
5.4.1 <i>Adsorção de proteínas</i>	46
5.4.3 <i>Análise topográfica</i>	49
5.4.6 <i>Testes Eletroquímicos</i>	55
5.6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	65

6 ARTIGO EM INGLÊS.....	75
6.1 ABSTRACT.....	75
6.2 INTRODUCTION.....	76
6.3 MATERIALS AND METHODS	78
6.3.1 <i>Sample preparation</i>	78
6.3.2 <i>Electric current density application</i>	79
6.3.3 <i>Protein adsorption analysis</i>	80
6.3.3.1 Determination of total proteins by colorimetric test	80
6.3.3.2 Quantitative analysis in real time, FT-IR spectroscopy (Fourier Transform Infrared).....	80
6.3.4 <i>Titanium surface analysis</i>	80
6.3.4.1 Scanning Electron Microscopy (SEM).....	80
6.3.4.2 Perfilometry.....	81
6.3.4.3 Atomic Force Microscopy (AFM).....	81
6.3.4.4 Open Potential Circuit (OCP) and Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS).....	81
6.3.5 <i>Statistical analysis</i>	81
6.4 RESULTS	82
6.4.1 <i>Protein adsorption</i>	82
6.4.3 <i>Topographic analysis</i>	84
6.4.6 <i>Electrochemical Tests</i>	90
6.5. DISCUSSION	94
6.6. CONCLUSION.....	98
6.7. REFERENCES.....	98
7.1 DESENVOLVIMENTO DA CÉLULA ELETROLÍTICA	99
7.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	100
7.3 APLICAÇÃO DA DENSIDADE DE CORRENTE ELÉTRICA (ENSAIO VALGANOSTÁTICO).....	100
7.4 ANÁLISE DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS.....	101
7.4.1 <i>Determinação das proteínas totais por teste colorimétrico – Método de Lowry</i>	101
7.4.2 <i>Análise quantitativa, em tempo real, FT-IR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)</i>	102
7.5 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO.....	103
7.5.1 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	103
7.5.2 <i>Perfilometria</i>	103

7.5.3 Microscopia de Força Atômica.....	103
7.5.4 Potencial de Circuito Aberto e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	104
7.5.5. Análise estatística	105
8 REFERÊNCIAS.....	107
9 APÊNDICE.....	117

1 INTRODUÇÃO

A terapia com implantes para substituição de elementos dentais em pacientes parcial ou totalmente edêntulos tornou-se uma técnica bem documentada e cientificamente aceita. Inicialmente, a instalação de implantes dentários tinha como objetivo reestabelecer a função mastigatória do paciente. Hoje em dia, além dessa função, pretende melhorar a estética, com tempo de tratamento curto e sucesso em longo prazo. A fim de atender as necessidades e expectativas dos pacientes, os dentistas têm procurado modelos de implantes dentários que permitam procedimentos cirúrgicos simples, diversas opções protéticas, boas soluções estéticas, componentes protéticos com precisão dimensional e superestruturas com estabilidade mecânica (Elias *et al.*, 2008).

Embora os implantes dentários têm mostrado taxas de sucesso aceitáveis, algumas situações clínicas resultam em relevantes fracassos: 1) pacientes com baixa qualidade óssea, 2) quantidade óssea inadequada e 3) doença sistêmica, são casos desafiadores à implantodontia (Alsaadi *et al.*, 2008). Por estas razões, a modificação da superfície dos implantes dentários, objetivando melhorar a interface osso-implante e reduzir o tempo de cicatrização, é um campo muito atraente e inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de aprimorar e encurtar o processo de osseointegração (Rosa e Beloti, 2003).

Para que um implante dentário seja funcional é necessário haver osseointegração. O tempo que se precisa para que os implantes se osseointegrem depende principalmente da capacidade de cicatrização de cada indivíduo, das características do implante utilizado e da técnica cirúrgica realizada. A literatura relata que o período médio de cicatrização é de aproximadamente doze semanas na maxila e de seis semanas na mandíbula (Puleo *et al.*, 1999).

O conceito de osseointegração descrito por Brånemark (1969) consiste em “uma conexão direta estrutural e funcional entre o osso vital organizado e a superfície de um implante de titânio capaz de receber carga funcional”. Este pesquisador ressaltou que a manutenção do implante é garantida pelo contato direto entre o tecido ósseo e o óxido da superfície de titânio.

O titânio comercialmente puro tornou-se um dos biomateriais mais utilizados para fabricação de implantes por apresentar propriedades desejáveis, como: alta resistência à corrosão e biocompatibilidade associada a alta resistência mecânica à tração (400-550 MPa) e baixa densidade (4,5 g cm⁻³). A resistência à corrosão e biocompatibilidade são resultantes da formação de uma película compacta de óxido de titânio, composto principalmente de TiO₂, com espessura de 2 a 20 nm e altamente protetora, quando em contato com fluidos teciduais. (Wang e Fenton, 1996; Niinomi, 2003). As ligas de titânio também apresentam excelente resistência à corrosão e biocompatibilidade, entre elas, a mais utilizada para aplicações biomédicas é Ti-6Al-4V (Niinomi, 2003).

Entretanto, uma reação da superfície de titânio com o meio oral e contato com o fluidos fisiológicos durante desempenho ocorre como comprovados por diversos estudos (Cruz, Souza, Henriques et al., 2011). Os íons metálicos liberados durante a corrosão podem induzir reações biológicas adversas, por exemplo: inflamação gengival (Contu *et al.*, 2002; Manaranche e Hornberger, 2007) e peri-implantar, perda óssea alveolar ao redor dos implantes dentários (Broggini *et al.*, 2003), assim como reações alérgicas, necrose local e muitos outros problemas de saúde (Cruz, Souza, Henriques et al., 2011). Além disso, pesquisadores (Manda *et al.*, 2009; Hey *et al.*, 2014) mostraram que a corrosão do titânio pode provocar alterações estéticas e comprometer as propriedades físicas.

Albrektsson *et al.* (1981) reconheceram que a capacidade funcional do implante de suportar carga é diretamente dependente da qualidade da interface entre o osso e o implante. E a biocompatibilidade, o desenho do implante, as características da superfície do implante, o estado do hospedeiro, a técnica cirúrgica e o controle das cargas após a instalação do implante influenciam na progressão sólida da osseointegração e são importantes para alcançar o sucesso. As propriedades da superfície mais importantes são: a topografia, a química, a carga de superfície e a molhabilidade (hidrofilia).

A fim de aprimorar o comportamento dos biomateriais metálicos, sua biocompatibilidade e também as suas propriedades mecânicas e físico-químicas, muitos estudos têm priorizado o conhecimento e aperfeiçoamento dos tratamentos de superfície (Thomas e Cook, 1985; Wilke *et al.* 1990; Buser *et al.* 1991; Bordji *et al.*, 1996;

Jimbo *et al.*, 2003; Ponsonnet *et al.*, 2003; Sela *et al.*, 2007; Hu e Yang, 2013).

Cochran *et al.* (1998) demonstraram que a rugosidade da superfície dos implantes de titânio afetam o grau de osseointegração e a fixação biomecânica. As superfícies macrotextrizadas podem sofrer o processo de texturização por *spray* de plasma de titânio e fosfato de cálcio (Cordioli *et al.*, 2000) ou por partículas como óxido de alumínio (Al_2O_3) e óxido de titânio (TiO_2) (Carvalho *et al.*, 2009). Por outro lado, as superfícies microtexturizadas são condicionadas por ácido, entre eles: ácido clorídrico (HCl) e o ácido sulfúrico (H_2SO_4). A deposição de camadas de fosfato de cálcio pelo processo biomimético, define as superfícies biomiméticas (Liu *et al.*, 2001). E as superfícies nanotextrizadas são obtidas pelo processo de oxidação eletroquímica (Al-Nawas *et al.*, 2008). Alguns fabricantes utilizam combinações de procedimentos para obter as alterações superficiais desejadas (Gahlert *et al.*, 2007). Essa texturização induz as plaquetas a liberar fatores de crescimento (PDGF) (Buser *et al.* 1991) e melhora a osteogênese (Davies, 2005).

Além da rugosidade de superfície, a química é outra variável importante para aposição óssea peri-implantar, porque influencia a carga de superfície e a molhabilidade. Molhabilidade da superfície é amplamente dependente da energia de superfície e influencia o grau de contato com o ambiente fisiológico. Dessa forma, a interação entre a superfície do implante e o ambiente biológico é diretamente proporcional à molhabilidade (Kilpadi e Lemons, 1994).

A adsorção de proteína sobre a superfície do óxido de titânio é importante para a osseointegração do implante, pois a reorganização do tecido adjacente depende desta adsorção, que ocorre a partir do líquido presente entre o implante e o tecido autógeno (Healy e Ducheyne , 1992). Logo após a formação da camada de hidratação, proteínas do sangue começam a aglomerar na superfície (Puleo *et al.*, 1999; MacDonald *et al.*, 2002). A molhabilidade, a energia de superfície e a química podem ser considerados fatores importantes para a determinação das características da adsorção de proteínas em superfícies metálicas (Deligianni *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2004). Além disso, a microestrutura e a rugosidade da superfície influenciam fortemente a molhabilidade das superfícies de implantes de titânio durante o contato inicial com o hospedeiro. Isto pode influenciar

a resposta biológica inicial da adsorção de proteínas do plasma, expressão das proteínas ósseas e, por conseguinte, induzir as respostas celulares do hospedeiro (Deligianni *et al.*, 2001; de Oliveira e Nanci, 2004; Lossdorfer *et al.*, 2004; Rupp *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Davies, 2005; Keller *et al.*, 2013). Assim, a adsorção de proteínas desempenha um papel crucial na integração de um implante dentro do corpo. É um processo dinâmico que envolve interações não-covalentes, tais como: as interações hidrofóbicas, eletrostáticas, forças de ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals (Andrade e Hlady, 1986).

Com o intuito de acelerar o processo de osseointegração, existem as alternativas biofísicas, tais como as mecânicas, as sônicas e as elétricas além das terapias bioquímicas osteoindutivas (Aaron *et al.*, 2006). Os primeiros estudos relativos ao efeito de carga ou tensão sobre as propriedades elétricas do osso demonstraram que a tensão de compressão provoca um potencial negativo entre os elétrodos inseridos, que conduzem a reabsorção óssea, enquanto que a tensão de tração gera um potencial positivo, causando o crescimento ósseo (Fukada e Yasuda, 1957; Bassett *et al.*, 1974). Estes resultados levaram ao desenvolvimento de diferentes métodos para a estimulação elétrica do osso. O método invasivo, e mais comumente utilizado, é o estímulo de corrente direta (CD); por outro lado, as formas não-invasivas de estimular o crescimento ósseo são: estímulo indutivo (EI) e estímulo capacitivo (EC) (Cochran, 1972).

Pesquisadores demonstraram que o estímulo elétrico, seja por CD, por geração de campo elétrico (EI) ou por EC, melhora a cicatrização óssea (Buch, Albrektsson e Herbs, 1984; Griffin e Bayat, 2011), a proliferação de células (Aro *et al.*, 1984), a liberação de prostaglandina E (Koreinstein *et al.*, 1984) e a síntese de matriz extracelular (Frienderberg *et al.*, 1989).

Shafer *et al.* (1995) analisaram a efetividade de estímulos elétricos associados aos implantes dentários, utilizando uma fonte externa acoplada aos implantes instalados na mandíbula de coelhos, com amplitude de 7,5 μ A. Os autores concluíram que a aplicação de corrente elétrica em baixa amperagem não tem efeito positivo na cicatrização óssea.

Shigino *et al.* (2000) avaliaram o efeito da aplicação do estímulo elétrico na melhora da osteogênese, em implantes dentários. Com uma aplicação diária por quatorze, vinte um e trinta dias, os

pesquisadores relataram aumento significativo no contato osso-implante, quando comparado ao grupo controle. O mesmo grupo de pesquisadores (Shigino *et al.*, 2001), no ano seguinte, avaliou os efeitos do estímulo elétrico na osteogênese, em implantes com carga funcional. Os autores sugeriram que o estímulo capacitivo aumenta a área de osso e promove a osteogênese, possivelmente proporcionando melhor osseointegração. Em outro estudo foram examinados os efeitos de um estímulo capacitivo distribuído por um gerador colocado mucoperiostealmente sobre os implantes dentários. Os resultados sugeriram a existência de maior contato osso-implante com estímulo elétrico, quando comparado com o grupo controle (Shayesteh *et al.*, 2007).

Song *et al.* (2009) avaliaram o efeito da aceleração na formação óssea por meio de um dispositivo eletrônico ligado ao implante dentário aplicando uma corrente elétrica direta, pulsada e bifásica, em mandíbula de cães, durante 3 e 5 semanas. Os resultados histológicos mostraram aceleração da formação óssea ao redor dos implantes, sugerindo que o tempo de latência da osseointegração pode ser reduzido quando são utilizados estímulos elétricos.

Pesquisadores (Barquero *et al.*, 2010) avaliaram a influência de estímulos elétricos em implantes dentários, por meio do torque de remoção, *in vivo*. O equipamento transmitiu diferentes amplitudes de corrente elétrica contínua (10 μA e 20 μA) em diferentes períodos (sete e quinze dias). Os autores não encontraram diferenças significativas entre os grupos testes e controle. Barquero *et al.* (2012) mensuraram o contato osso-implante e a área de formação óssea, estimulados por corrente elétrica contínua (10 μA e 20 μA), em um período de sete e quinze dias, na tíbia de cães. Para o grupo de sete dias não ocorreram diferenças estatísticas, enquanto o grupo de quinze dias apresentou maior contato osso-implante e formação óssea. Os autores concluíram que o estímulo elétrico associado aos implantes dentários, proporciona maior contato osso-implante, bem como formação óssea, quando comparado com implantes que não utilizam esse dispositivo.

Considerando a importância das alterações na superfície dos implantes de titânio na qualidade e no sucesso da osseointegração e a pouca compreensão do efeito da estimulação elétrica em titânio, na presença de proteínas, faz-se também necessário testes *in vitro* para avaliar diferentes parâmetros separadamente. Neste sentido, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito da aplicação de diferentes

densidades de corrente elétrica (5 μA e 10 μA) na superfície de titânio comercialmente puro grau IV e Ti6Al4V imersos em meio fisiológico simulado.

2 PERGUNTAS DE PESQUISA

2.1 PERGUNTA PRINCIPAL

Quais são as alterações em superfície de titânio são decorrentes de estimulação elétrica, em meio fisiológico simulado?

2.2 PERGUNTAS SECUNDÁRIAS

- Qual a influência de diferentes amperagens de corrente elétrica na adsorção de proteínas nos diferentes materiais: Ti-CP e Ti6Al4V?
- Qual a influência na rugosidade da superfície de Ti-CP e da superfície de Ti6Al4V com a aplicação de diferentes amperagens de corrente elétrica?
- A aplicação de diferentes amperagens de corrente elétrica em meio fisiológico simulado altera a resistência dos materiais (Ti-CP e Ti6Al4V) à corrosão?

3 JUSTIFICATIVA

Dado aos resultados positivos de pesquisas realizadas pelo grupo de pesquisadores do Centro de Estudos e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID) ao avaliar a influência de estímulos elétricos na osseointegração de implantes de titânio, instalados em tíbia de cães, e devido, também, aos resultados positivos encontrados na literatura, tanto *in vivo* quanto *in vitro* com células, surge a curiosidade de avaliar a influência da aplicação de diferentes densidades de corrente elétrica na presença de proteínas, *in vitro*.

A escolha de duas diferentes amperagens de corrente elétrica – 5 e 10 μA – deve-se à área da superfície das amostras de titânio, calculadas a partir da dimensão dos corpos de prova, tendo como base as pesquisas realizadas pelo CEPID, que utilizaram dispositivos elétricos com aplicação de 10 e 20 μA , *in vivo*. Manteve-se o estímulo de corrente direta e contínua. E em relação ao meio, optou-se pela solução composta por Meio de Eagle Modificado por Dulbecco + 10% Soro Fetal Bovino, devido à presença de proteínas e sua frequente utilização em cultura celular.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações em superfície de titânio – Ti-CP e Ti6Al4V – após estimulação elétrica, em meio fisiológico simulado.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma célula eletrolítica bioinerte e auto-clavável, capaz de manter a solução e receber os eletrodos necessários para a aplicação de corrente elétrica;
- Quantificar as proteínas totais adsorvidas na superfície de titânio (Ti-CP e Ti6Al4V) após aplicação de diferentes amperagens de corrente elétrica, utilizando o método de Lowry;
- Verificar a existência de modificações químicas na superfície de titânio (Ti-CP e Ti6Al4V) após aplicação de diferentes amperagens de corrente elétrica em meio fisiológico simulado, por meio dos testes Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS);
- Observar e quantificar a rugosidade decorrente da aplicação de diferentes amperagens de corrente elétrica sobre a superfície de titânio (Ti-CP e Ti6Al4V) por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), teste de perfilometria e Microscopia de Força Atômica (AFM), a partir dos parâmetros: rugosidade média (R_a), rugosidade máxima total (R_t) e raiz do valor quadrático médio (RMV);
- Verificar a resistência à corrosão do titânio (Ti-CP e Ti6Al4V) quando submetidos à aplicação de diferentes amperagens de corrente elétrica em meio fisiológico simulado, por meio de testes eletroquímicos (potencial de circuito aberto e impedância eletroquímica).

5 ARTIGO EM PORTUGUÊS

ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO EM MEIO FISIOLÓGICO SIMULADO

5.1 RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da estimulação elétrica em superfície de titânio imersa em um meio fisiológico simulado.

Materiais e Métodos: Discos de titânio comercialmente puro grau IV e liga de Ti6Al4V com dimensões de 8 por 15 mm foram polidos com lixas d'água de granulometrias decrescentes até 2500 e, posteriormente, polidas com feltro e alumina (1,0 μm ; 0,5 μm e 0,3 μm). As amostras foram limpas com álcool 70% e com água destilada durante 10 minutos sob vibração ultra-sônica. Após esterilizadas, as amostras foram conectadas a um potenciostato, que induziu e monitorou corrente elétrica direta e constante sobre a superfície. As amostras de titânio foram inseridas em uma célula eletrolítica contendo meio eletrolítico e divididas em 2 grupos: Ti-CP e Ti6Al4V e cada grupo subdividido conforme a aplicação de corrente elétrica e meio eletrolítico: C1 (0 μA sem meio); C2 (0 μA imersas em DMEM e soro fetal bovino); 5 μA e 10 μA (imersas em DMEM e soro fetal bovino). Após estimulação elétrica, avaliou-se a adsorção de proteínas por testes quantitativos de Lowry e FTIR. As superfícies de titânio foram caracterizadas por testes eletroquímicos de potencial de corrosão e impedância e por análise topográfica a partir de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Resultados: A partir das análises por FTIR, observou-se a presença de bandas de energia características de amida em todas as amostras submersas em solução fisiológica indicando a presença de proteínas. Pelo método de Lowry a maior quantidade de proteína total adsorvida ocorreu nos subgrupos C2 ($p < 0,05$). Quanto às alterações morfológicas, o teste de perfilometria indicou maiores valores de Ra para as amostras de titânio puro submetidas a 10 μA ($p < 0,05$). As superfícies de Ti6Al4V apresentaram os maiores valores de Ra para 5

μA , mas sem diferença estatística com o subgrupo $10 \mu\text{A}$ ($p > 0,05$). As imagens do MEV não revelaram diferenças entre os grupos. Quando submetidas aos testes eletroquímicos, as amostras testes ($5 \mu\text{A}$ e $10 \mu\text{A}$) apresentaram maior resistência à corrosão.

Conclusão: Foram encontradas alterações eletroquímicas e topográficas em superfície de Ti-CP e Ti6Al4V após estimulação elétrica em meio fisiológico simulado.

Palavras-chave: Estimulação por corrente contínua, Corrosão, Titânio, Eletroquímica.

5.2 INTRODUÇÃO

A terapia com implantes para substituição de elementos dentais em pacientes parcial ou totalmente edêntulos tornou-se uma técnica bem documentada e cientificamente aceita (Elias, *et al.*, 2008). Para que o implante dentário seja funcional é necessário haver osseointegração. O tempo necessário para os implantes osseointegrem depende principalmente da capacidade de cicatrização de cada indivíduo, do tipo de superfície do implante e da técnica cirúrgica realizada. A literatura relata que o período médio de cicatrização é de aproximadamente doze semanas na maxila e de seis semanas na mandíbula (Puleo *et al.*, 1999).

O titânio comercialmente puro tornou-se um dos biomateriais mais utilizados para fabricação de implantes por apresentar propriedades desejáveis, como: alta resistência à corrosão e biocompatibilidade associada a alta resistência mecânica à tração (400-550 MPa) e baixa densidade ($4,5 \text{ g cm}^{-3}$). A resistência à corrosão e biocompatibilidade são resultantes da formação de uma película compacta de óxido de titânio, composto principalmente de TiO_2 , com espessura de 2 a 20 nm e altamente protetora, quando em contato com fluidos teciduais. (Wang e Fenton, 1996; Niinomi, 2003). As ligas de titânio também apresentam excelente resistência à corrosão e biocompatibilidade, entre elas, a mais utilizada para aplicações biomédicas é Ti-6Al-4V (Niinomi, 2003).

Entretanto, uma reação da superfície de titânio com o meio oral e contato com o fluidos fisiológicos durante desempenho ocorre como comprovados por diversos estudos (Cruz, Souza, Henriques *et al.*, 2011). Os íons metálicos liberados durante a corrosão podem induzir reações biológicas adversas, por exemplo: inflamação gengival (Contu

et al., 2002; Manaranche e Hornberger, 2007) e peri-implantar, perda óssea alveolar ao redor dos implantes dentários (Broggini *et al.*, 2003), assim como reações alérgicas, necrose local e muitos outros problemas de saúde (Cruz, Souza, Henriques *et al.*, 2011). Além disso, pesquisadores (Manda *et al.*, 2009; Hey *et al.*, 2014) mostraram que a corrosão do titânio pode provocar alterações estéticas e comprometer as propriedades físicas.

A fim de aprimorar o comportamento dos biomateriais metálicos, sua biocompatibilidade e também as suas propriedades mecânicas e físico-químicas, muitos estudos têm priorizado o conhecimento e aperfeiçoamento dos tratamentos de superfície (Thomas e Cook, 1985; Wilke *et al.* 1990; Buser *et al.* 1991; Bordji *et al.*, 1996; Jimbo *et al.*, 2003; Ponsonnet *et al.*, 2003; Sela *et al.*, 2007; Hu e Yang, 2013).

A adsorção de proteína sobre a superfície do óxido de titânio é importante para a osseointegração do implante, pois a reorganização do tecido adjacente depende desta adsorção, que ocorre a partir do líquido presente entre o implante e o tecido autógeno (Healy e Ducheyne, 1992). Logo após a formação da camada de hidratação, proteínas do sangue começam a aglomerar na superfície (Puleo *et al.*, 1999; MacDonald *et al.*, 2002). A molhabilidade, a energia de superfície e a química podem ser considerados fatores importantes para a determinação das características da adsorção de proteínas em superfícies metálicas (Deligianni *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2004). Além disso, a microestrutura e a rugosidade da superfície influenciam fortemente a molhabilidade das superfícies de implantes de titânio durante o contato inicial com o hospedeiro. Isto pode influenciar a resposta biológica inicial da adsorção de proteínas do plasma, expressão das proteínas ósseas e, por conseguinte, induzir as respostas celulares do hospedeiro (Deligianni *et al.*, 2001; de Oliveira e Nanci, 2004; Lossdorfer *et al.*, 2004; Rupp *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Davies, 2005; Keller *et al.*, 2013). Assim, a adsorção de proteínas desempenha um papel crucial na integração de um implante dentro do corpo. É um processo dinâmico que envolve interações não-covalentes, tais como: as interações hidrofóbicas, eletrostáticas, forças de ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals (Andrade e Hlady, 1986).

Com o intuito de acelerar o processo de osseointegração, existem as alternativas biofísicas, tais como as mecânicas, as sônicas e

as elétricas além das terapias bioquímicas osteoindutivas (Aaron *et al.*, 2006). Os primeiros estudos relativos ao efeito de carga ou tensão sobre as propriedades elétricas do osso demonstraram que a tensão de compressão provoca um potencial negativo entre os elétrodos inseridos, que conduzem a reabsorção óssea, enquanto que a tensão de tração gera um potencial positivo, causando o crescimento ósseo (Fukada e Yasuda, 1957; Bassett *et al.*, 1974). Estes resultados levaram ao desenvolvimento de diferentes métodos para a estimulação elétrica do osso. O método invasivo, e mais comumente utilizado, é o estímulo de corrente direta (CD); por outro lado, as formas não-invasivas de estimular o crescimento ósseo são: estímulo indutivo (EI) e estímulo capacitivo (EC) (Cochran, 1972).

Pesquisadores demonstraram que o estímulo elétrico, seja por CD, por geração de campo elétrico (EI) ou por EC, melhora a cicatrização óssea (Buch, Albrektsson e Herbs, 1984; Griffin e Bayat, 2011), a proliferação de células (Aro *et al.*, 1984), a liberação de prostaglandina E (Koreinstein *et al.*, 1984) e a síntese de matriz extracelular (Frienderberg *et al.*, 1989). Estudos *in vivo* também mostraram que a aplicação do estímulo elétrico promove osteogênese (Shigino *et al.*, 2000), melhora a osseointegração (Shigino *et al.*, 2001 e proporciona maior contato-osso implante (Shayesteh *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009; Barquero *et al.*, 2012). Todavia, Shafer *et al.* (1995) concluíram que a aplicação de corrente elétrica em baixa amperagem não tem efeito positivo na cicatrização óssea. Barquero *et al.* (2010) demonstraram que o estímulo elétrico não influenciou os valores de torque de remoção.

Considerando a importância das alterações na superfície dos implantes de titânio na qualidade e no sucesso da osseointegração e a pouca compreensão do efeito da estimulação elétrica em titânio, na presença de proteínas, faz-se também necessário testes *in vitro* para avaliar diferentes parâmetros separadamente. Neste sentido, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o efeito da aplicação de diferentes amperagens de corrente elétrica (5 μ A e 10 μ A) na superfície de titânio comercialmente puro grau IV e Ti6Al4V imersos em meio fisiológico simulado.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Preparação das amostras

Amostras cilíndricas (8x15mm) de titânio comercialmente puro grau IV e liga Ti6Al4V (BiorAcnis, Brasil) foram cortadas a partir de barras. Os discos de titânio foram polidos com lixas d'água de granulometrias decrescentes de 200 até 2500 e posteriormente com feltro e alumina (1,0 μm ; 0,5 μm e 0,3 μm). Após o polimento, realizou-se banho de ultrassom com álcool 70% e com água destilada durante 10 minutos. Em seguida, levaram-se as amostras à auto-clave para serem esterilizadas durante 20 min e armazenadas em estufa a 30 °C durante 24 horas.

5.3.2 Aplicação de corrente elétrica (ensaio Galvanostático)

Os ensaios com aplicação de corrente elétrica foram realizados por meio do ensaio Galvanostático. Utilizou-se uma célula eletroquímica com capacidade para 5 mL de solução, que comporta três eletrodos - projetada e confeccionada de forma a manter a solução inalterada e a permitir a inserção dos eletrodos. O eletrodo de trabalho (ET) consistiu das amostras citadas acima, nas quais se fez um contato elétrico com fio de cobre. O eletrodo de referência (ER) foi de prata/cloreto de prata em solução de KCl saturado (Ag/AgCl(KCl_{sat})), e o contra eletrodo (CE) foi uma placa de platina. Os ensaios de CP foram realizados em um potenciostato PalmSens (Palm Instruments BV, Holanda) acoplado a um microcomputador que rodava o *software* PStTrace 4.4 para aquisição e análise dos dados. Utilizou-se um volume de 5000 μL de solução de trabalho, composta por Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Invitrogen) + 10% Soro Fetal Bovino (FBS) (Gibco, Invitrogen) + Antibióticos (1% penicilina/estreptomicina) (Sigma-Aldrich), pH 7,4. As células eletroquímicas foram esterilizadas em estufa com luz ultra violeta durante 30 min, assim como os eletrodos. Após a esterilização, todo o aparato foi transferido para uma estufa, a 36 °C com controle de umidade e de concentração de CO₂.

As amostras foram divididas em dois grupos, dependendo do biomaterial utilizado: Ti-CP e Ti6Al4V, para realização dos ensaios galvanostáticos. A divisão em subgrupos baseou-se na quantidade de corrente que seria aplicada ao ET. Aplicou-se diferentes amperagens de

corrente elétrica durante 3 horas (Yang *et al.*, 2003) em cada subgrupo: C1 (0 μA – ausência de meio), C2 (0 μA – presença de meio), 5 μA e 10 μA . O potencial resultante, fruto da diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e de referência, foi monitorado a cada 30 segundos durante os testes.

Ti-CP:	C1 (Controle 1 – 0 μA – ausência de DMEM + FBS)
	C2 (Controle 2 – 0 μA – presença de DMEM + FBS)
	5 μA (Aplicação de 5 μA em meio DMEM + FBS)
	10 μA (Aplicação de 10 μA em meio DMEM + FBS)
Ti6Al4V:	C1 (Controle 1 – 0 μA – ausência de DMEM + FBS)
	C2 (Controle 2 – 0 μA – presença de DMEM + FBS)
	5 μA (Aplicação de 5 μA em meio DMEM + FBS)
	10 μA (Aplicação de 10 μA em meio DMEM + FBS)

5.3.3 Análise da adsorção de proteínas

5.3.3.1 Determinação das proteínas totais por teste colorimétrico

Realizou-se o Método de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951). Para análise utilizou-se o espectrofotômetro UV-VIS (Molecular Devices, Spectra Max Plus 384, EUA) no comprimento de onda de 750 nm.

5.3.3.2 Análise quantitativa, em tempo real, FT-IR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)

Realizou-se a lavagem dos discos de titânio com solução tampão fosfato salino (PBS) e a fixação em glutaraldeído 2,5% por 1 hora. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (30 - 100%) por 15 min cada. Após a secagem, em estufa a 30 °C durante 12 horas, obteve-se o espectro de absorção de Infravermelho utilizando FT-IR em modo de refletância

total atenuada (ATR) (Bruker, Tensor 27). Analisaram-se as amostras pelo modo de transmitância na região entre 4000-600 cm^{-1} , por acúmulo de 32 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1} .

Conforme literatura (Yu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2014), o espectro de BSA (do inglês, *bovine serum albumin*) exibe duas bandas de absorção vibracional em cerca de 1.700 a 1.600 cm^{-1} e 1.550 a 1.500 cm^{-1} que pode ser atribuído a C=O modo de alongamento da amida I e a N-H modo de flexão da amida II, respectivamente.

5.3.4 Análise da superfície de titânio

5.3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 5.3.3.2 e posteriormente recobertas com uma camada de Ouro-Paládio. Utilizou-se MEV (JEOL JSM-6390LV), com fonte de elétrons de tungstênio, detector de elétrons secundários e nas tensões entre 10 e 15 kV. Obtiveram-se cinco áreas em diferentes ampliações (x100, x500, x1000, x2000, x3000) em uma amostra de cada grupo. As amostras foram analisadas por meio de Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS), para observar sua composição química.

5.3.4.2 Perfilometria

Realizou-se a lavagem dos discos de titânio com água destilada estéril e a extração das proteínas com Tween 20 a 1% com água destilada, aquecido por 30 min a 100 °C (Liljas, *et al.*, 1974). A secagem foi realizada em estufa a 30 °C durante 12 horas. Posteriormente, mediu-se a rugosidade superficial de duas amostras de cada grupo, por meio de um perfilômetro óptico (Bruker, DektakXT, EUA). Obtiveram-se cinco áreas de 200 μm , em cada disco, percorrida por agulha de diamante de 2 μm , resultando nas medidas de rugosidade média (R_a) e rugosidade máxima total (R_t).

5.3.4.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As amostras, com extração de proteína, foram preparadas conforme descrito no item 5.3.4.2 e analisadas por AFM (Nanosurf FlexAFM easyScan 2 Controller, Suíça), operando em modo "*Tapping*" - contato intermitente, ponta modelo NCLR (raio < 10 nm), frequência de ressonância 190 kHz, constante de mola 48 N m⁻¹ e velocidade de varredura linha s⁻¹. As imagens foram processadas e os valores R_a e raiz do valor quadrático médio (RMS) calculados com o software AFM WSxM4.0. (Nanotec Electronica, Espanha), a partir da área de 13 μm × 13 μm sobre a superfície da amostra.

5.3.4.4 Potencial de Circuito Aberto (OCP) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

Os testes foram realizados após ensaios de CP. Nas caracterizações eletroquímicas, mediu-se o OCP durante 30 min, seguido por EIS. Os ensaios de EIS foram realizados em circuito aberto, com uma varredura de frequências na faixa de 10⁵ Hz a 10⁻² Hz, com uma onda senoidal de 10 mV de amplitude e frequência de varredura de 5 frequências/década. Estes testes foram realizados em um potenciostato Voltalab PGZ100 (Radiometer Copenhagen, Dinamarca) acoplado a um computador utilizando o *software* Voltmaster 4.0, para análise e tratamento dos dados. Utilizou-se as mesmas células eletroquímicas com o mesmo arranjo de eletrodos citados na seção 6.3.2, em temperatura ambiente. Para cada amostra, esta sequência foi completada 3 vezes.

5.3.5 Análise estatística

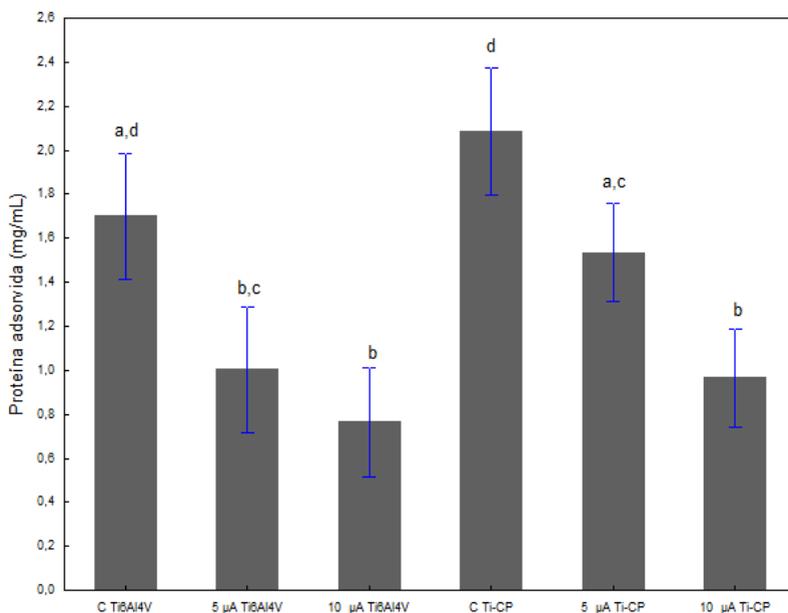
Realizaram-se a análise de variância (One-Way ANOVA) e o teste de Tukey para as comparações múltiplas (STATISTICA, Statsoft Inc, USA). Adotou-se um nível de significância de 5% (p < 0,05).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Adsorção de proteínas

Os resultados da quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry são apresentados na Figura 1.

Figura 1. Concentração de proteína total adsorvida sobre as superfícies de Ti6Al4V e Ti-CP: C (controle na presença de meio) 5 μ A e 10 μ A.



Considerando a adsorção de proteínas sobre Ti-CP, foram encontradas diferenças estatísticas entre todos os subgrupos: controle (20%), 5 μ A (15%) e 10 μ A (9%). Em análise do grupo Ti6Al4V, os resultados de adsorção de proteínas foram estatisticamente diferentes entre os subgrupos controle (16%), 5 μ A (10%) e 10 μ A (7%). No entanto, os subgrupos testes não apresentaram diferença estatística entre si. Foi detectada maior adsorção de proteínas nos subgrupos controles de ambos os materiais com valores de $1,70 \pm 0,08$ mg/mL sobre Ti6Al4V e $2,90$ mg/mL $\pm 0,01$ sobre Ti-CP. Assim, a aplicação de corrente elétrica contínua apresentou um efeito de inibição da adsorção de proteínas totais sobre as superfícies de titânio.

Os resultados da avaliação da adsorção de proteínas sobre as superfícies de titânio por ATR-FTIR são mostrados na Fig. 2 e 3.

Figura 2. Espectros obtidos por ATR-FTIR das amostras de Ti-CP após imersão nos meios fisiológicos simulados (DMEM e soro fetal bovino): grupo controle (C2); aplicação de estímulo elétrico ($5\mu\text{A}$ e $10\mu\text{A}$).

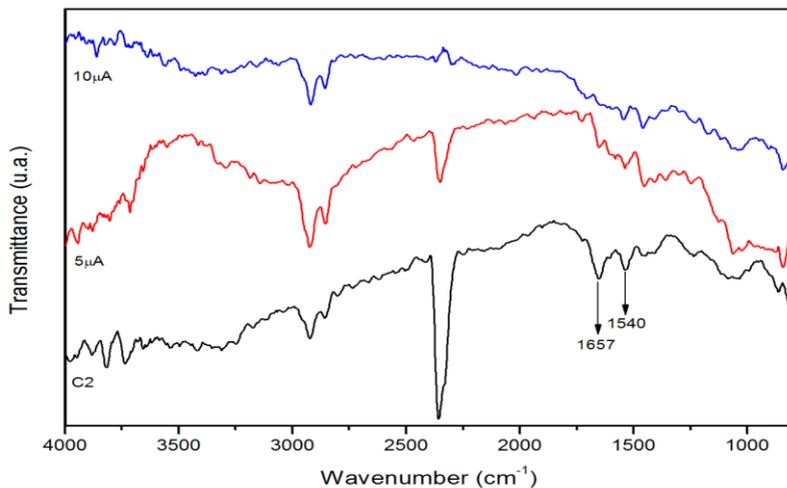
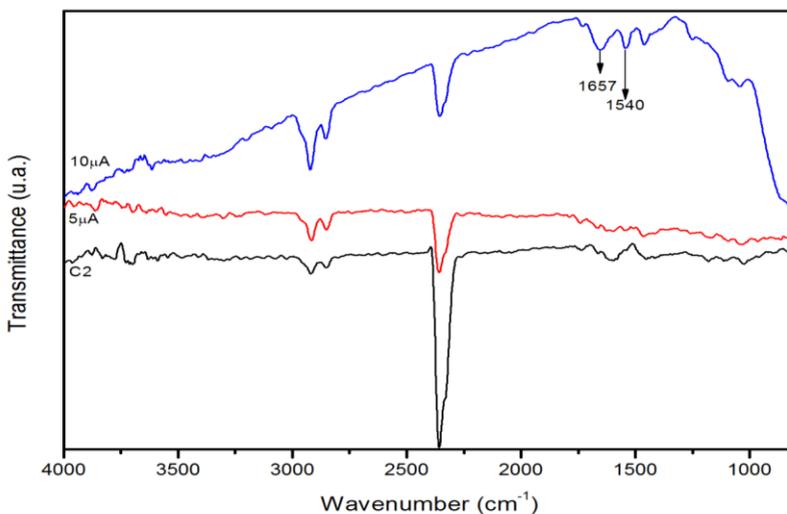


Figura 3. Espectros obtidos por ATR-FTIR das amostras de Ti6Al4V após imersão nos meios fisiológicos simulados (DMEM e FBS): grupo controle (C2); aplicação de estímulo elétrico ($5\mu\text{A}$ e $10\mu\text{A}$).



Como observado nas Figuras 2 e 3, foram identificadas duas bandas em 1.657 cm^{-1} e 1.540 cm^{-1} , tanto nas amostras (C2, $5\mu\text{A}$ e $10\mu\text{A}$) do grupo Ti-CP, quanto nas amostras do grupo Ti6Al4V. Estes resultados indicam a presença de grupos C=O e N-H sobre as superfícies sugerindo a adsorção de BSA presentes no FBS sobre a superfície de titânio.

5.4.3 Análise topográfica

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram a morfologia da superfície das amostras dos grupos Ti-CP e Ti6Al4V após imersão no meio fisiológico simulado e aplicação de corrente elétrica. Na Figura 4, não é possível diferenciar se houve alterações nas superfícies de Ti-CP após aplicação de corrente elétrica considerando este tipo de análise e ampliação. O mesmo ocorreu para as superfícies de Ti6Al4V.

Figura 4. Imagem obtida por MEV mostrando a topografia da superfície dos discos de Ti-CP após imersão no meio fisiológico e estimulação elétrica. (A) C2 – controle com meio, (B) $5\mu\text{A}$ e (C) $10\mu\text{A}$. Método de elétrons secundários, ampliação original de 2,000 X e voltagem de 15 kV.

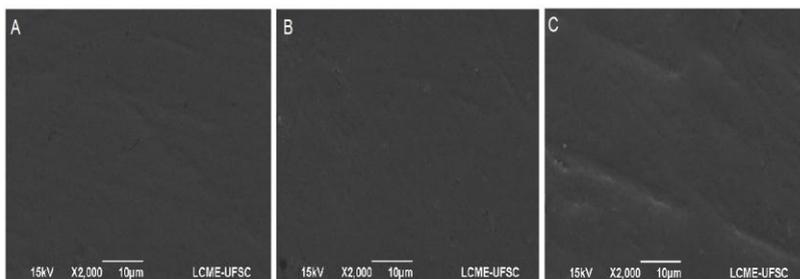
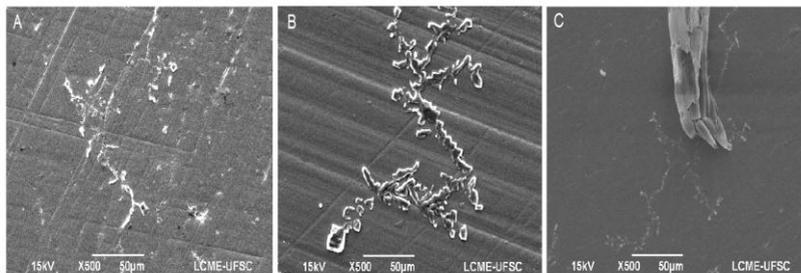
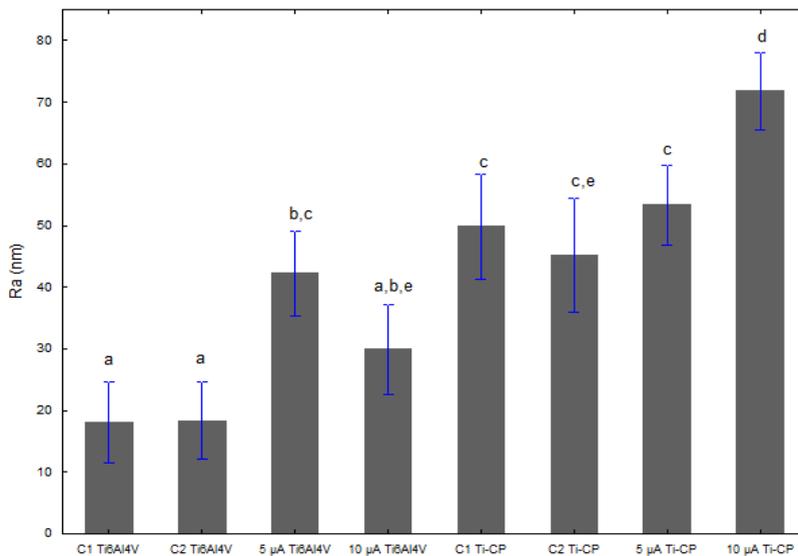


Figura 5. Imagem obtida por MEV mostrando a topografia da superfície dos discos de Ti6Al4V após imersão no meio fisiológico e estimulação elétrica. (A) C2 – controle com meio, (B) 5 μ A e (C) 10 μ A. Método de elétrons secundários, ampliação original de 500 X e voltagem de 15 kV.



Os valores de R_a das superfícies Ti-CP e Ti6Al4V são apresentados na Figura 6.

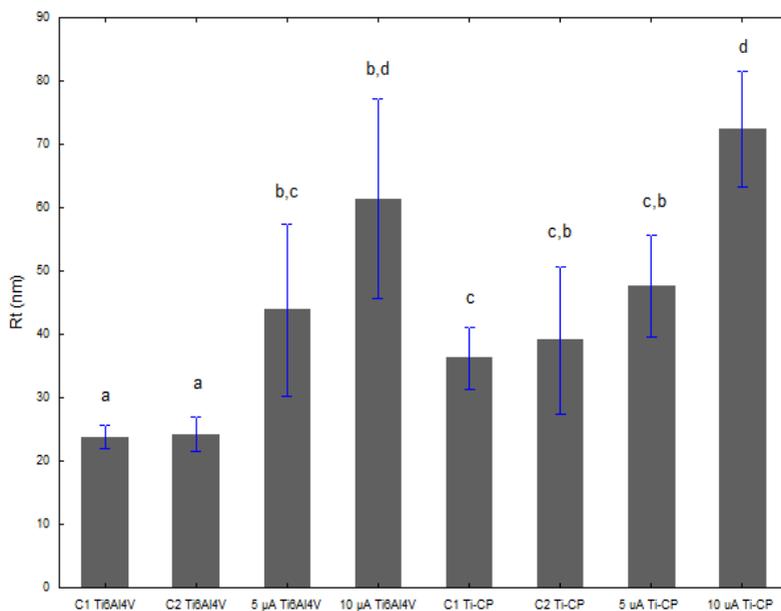
Figura 6. Valores da rugosidade média (R_a) das superfícies de Ti6Al4V e Ti-CP após imersão em solução fisiológica simulada e aplicação de corrente elétrica. C1 – controle sem meio; C2 – controle com meio; estimulação elétrica em 5 μ A e 10 μ A.



No grupo Ti-CP, foram identificadas diferenças estatísticas apenas entre o subgrupo 10 μA ($71,82 \pm 16,98$ nm) e os demais. Enquanto, no grupo Ti6Al4V, diferença estatística foram notadas entre os subgrupos controle (C1 e C2) e o subgrupo 5 μA , porém, os subgrupos testes não apresentam diferença estatística entre si. Os subgrupos controles (C1 e C2) para Ti6Al4V e Ti-CP apresentaram valores de rugosidade R_a estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Assim como, os subgrupos 10 μA para Ti6Al4V e Ti-CP apresentaram valores de rugosidade R_a estatisticamente diferentes dos subgrupos de 5 μA para Ti6Al4V e Ti-CP ($p < 0,05$).

Os valores de rugosidade em parâmetro R_t são das superfícies Ti6Al4V e Ti-CP são apresentados na Figura 7.

Figura 7. Valores da rugosidade em parâmetro R_t das superfícies de Ti6Al4V e Ti-CP após imersão em solução fisiológica simulada e aplicação de corrente elétrica. C1 –controle sem meio; C2 – controle com meio; estimulação elétrica em 5 μA e 10 μA .

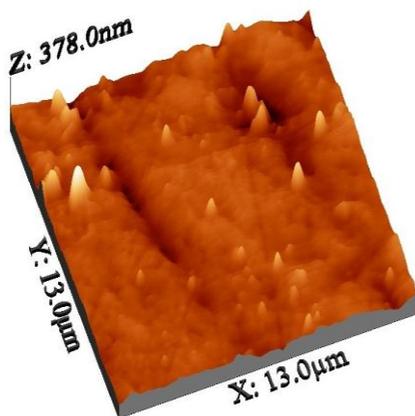


Avaliando o grupo Ti-CP, foram encontrados valores de rugosidade Rt estatisticamente diferentes entre o subgrupo 10 μA ($72,38 \pm 11,86$ nm) e os demais ($p < 0,05$). Houve diferenças estatisticamente significante entre valores de rugosidade Rt para os subgrupos controle (C1 e C2) e os subgrupos testes (5 e 10 μA) considerando o grupo Ti6Al4V ($p < 0,05$). Por outro lado, quando comparados os valores de rugosidade Rt para subgrupos controles (C1 e C2), 5 μA e 10 μA de ambos os materiais observa-se que houve diferença estatística apenas entre os valores dos subgrupos controles ($p < 0,05$). Os resultados sugerem maior influência da aplicação de corrente elétrica na intensidade de 10 μA na superfície de titânio puro.

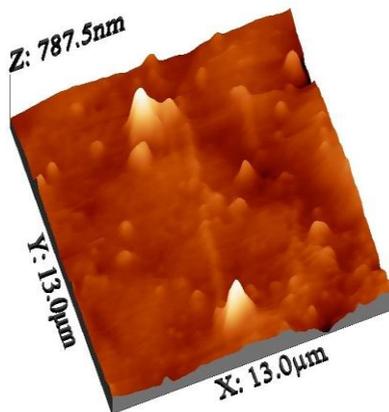
As imagens tridimensionais obtidas por AFM revelando a topografia das superfícies após os ensaios de adsorção e extração de camada de adsorção do meio fisiológico simulado são reveladas nas Figuras 8 e 9.

Figura 8. Imagens do AFM mostram a topografia da superfície dos discos de Ti-CP: (A) C1; (B) C2; (C) 5 μ A e (D) 10 μ A.

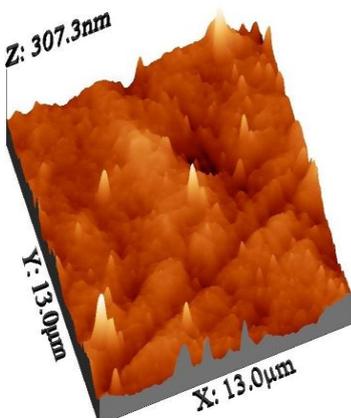
A



B



C



D

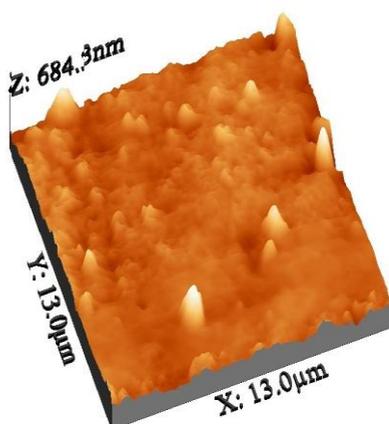
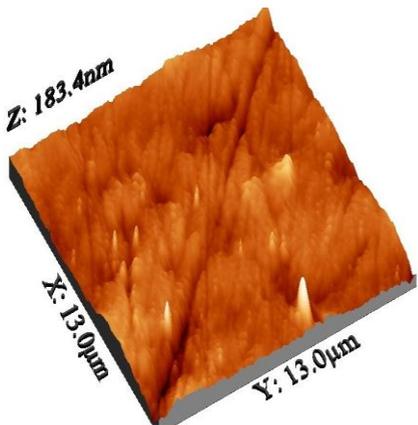
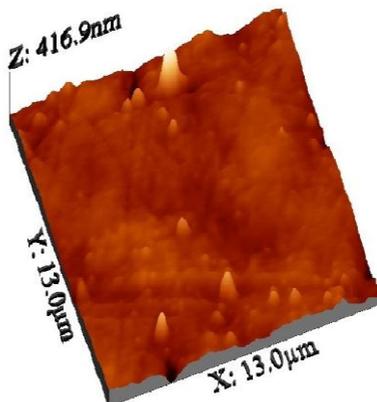


Figura 9. Imagens do AFM mostram a topografia da superfície dos discos de Ti6Al4V: (A) C1; (B) C2; (C) 5 μ A e (D) 10 μ A.

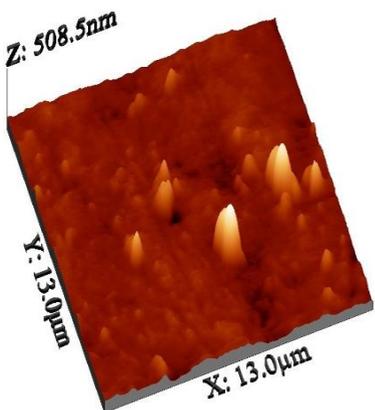
A



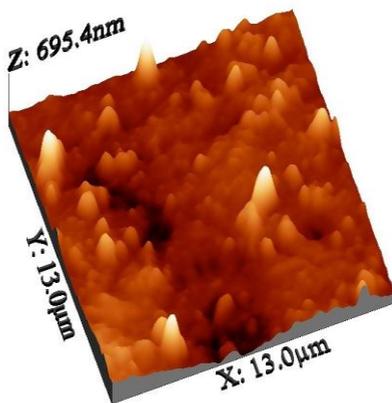
B



C



D



Na tabela 1, são encontrados os valores de rugosidade pelos parâmetros RMS e R_a . Foram observados maiores valores de rugosidade RMS e R_a para ambos os materiais após aplicação de estímulo elétrico a 10 μA exceto no subgrupo C2 para o Ti-CP. Provavelmente, houve contaminação por camada de resíduos durante adsorção e remoção da camada proteica.

Tabela 1. Valores de rugosidade RMS e R_a para Ti-CP e Ti6Al4V.

Ti-CP	RMS (nm)	R_a (nm)
C1	27.3843	18.7820
C2	65.1580	41.2877
5 μA	21.4554	15.3891
10 μA	48.0409	33.1642
Ti6Al4V	RMS (nm)	R_a (nm)
C1	15.2641	11.2960
C2	23.4282	16.1540
5 μA	35.4121	19.1324
10 μA	75.1129	51.8034

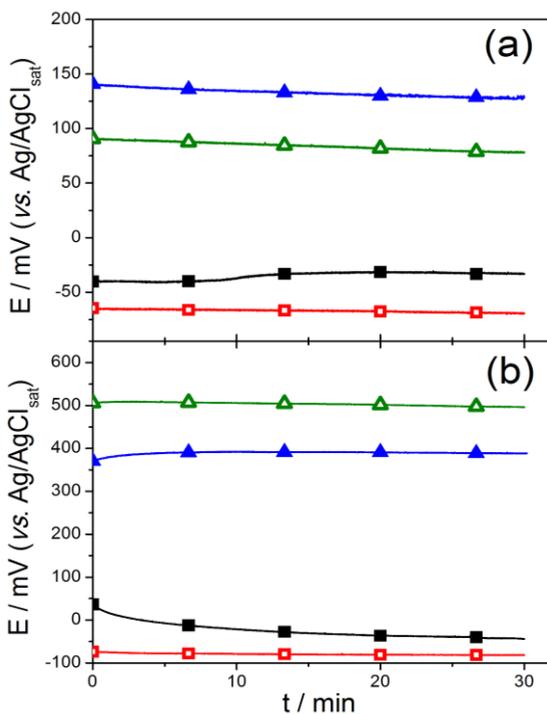
5.4.6 Testes Eletroquímicos

A evolução do potencial de circuito aberto (OCP) em função do tempo em solução de DMEM + FBS ou PBS (pH 7,4) (subgrupo C1) é mostrada na Fig. 10. Observou-se que os valores de OCP dos subgrupos testes (5 μA e 10 μA) são mais positivos quando comparados com os subgrupos controle (C1 e C2) para o grupo Ti-CP (Fig. 10 a). Para Ti-CP o perfil das curvas dos grupos testes foram semelhantes e estabilizaram após alguns minutos, enquanto C1 apresentou uma leve subida nos valores de OCP em 10 min e depois estabilizou e C2 permaneceu praticamente estável durante todo o período.

Em relação ao grupo Ti6Al4V (Fig. 10 b), também observou-se que os valores de OCP dos subgrupos testes (5 μA e 10 μA) são mais positivos quando comparados com os subgrupos controle (C1 e C2). Quanto ao perfil das curvas, o subgrupo 10 μA apresentou uma leve descida nos primeiros minutos, estabilizando após 10 minutos. Para o subgrupo 5 μA ocorreu o inverso, uma leve subida nos valores de OCP e estabilização após 10 minutos. O subgrupo C1 iniciou com valores positivos, estabilizando em valores negativos. E o subgrupo C2

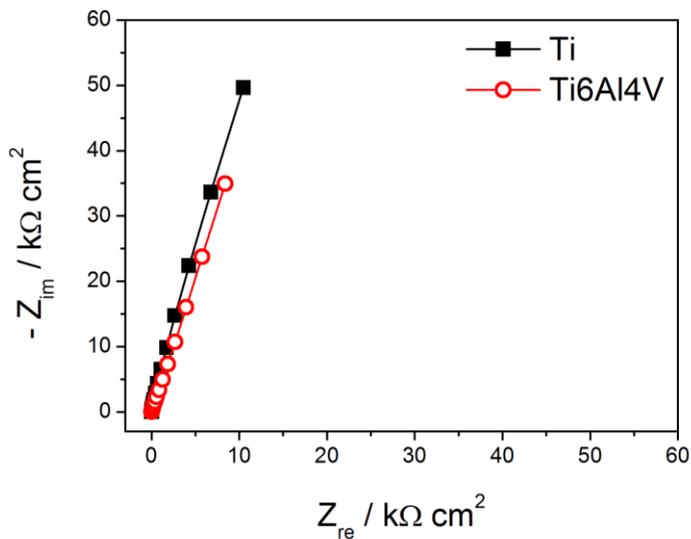
expressou valores de OCP negativos (os valores mais negativos de OCP entre as amostras) e estáveis durante todo o período. Os valores finais de OCP podem ser observados na Tabela 2.

Figura 10. OCP: (a) Ti-CP (b) Ti6Al4V para: ■ C1 (PBS), □ C2 (DMEM + FBS), ▲ 5 μ A e △ 10 μ A.

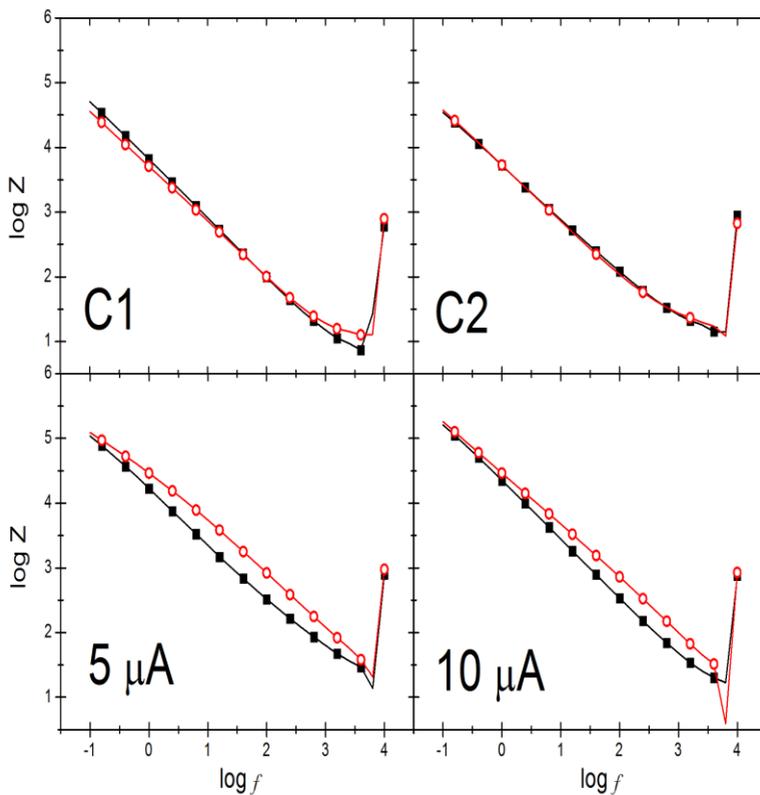


No diagrama de Nyquist (Fig.11), as amostras C1 (controle em solução de PBS) exibem uma tendência a formar um semicírculo, no entanto, é um dado incompleto ao longo da faixa de frequências analisadas.

Figura 11. Diagrama de Nyquist: ■ Controle Ti-CP e ○ Controle Ti6Al4V



Na Figura 12, observou-se que o perfil das curvas de impedância é semelhante para todas as amostras, independente do material. Entretanto, os valores de $\log Z$ são diferentes, mas assemelham-se nos grupos testes (5 μA e 10 μA) e nos grupos controles (C1 e C2), conforme a Tabela 2.

Figura 12. Gráficos de Impedância total vs. Frequência. ■ Ti-CP e ○ Ti6Al4V

Na Figura 13, observou-se a similaridade do ângulo de fase dos grupos testes (5 μA e 10 μA), em que há dois platôs, identificado pelas setas, enquanto nos grupos controles (C1 e C2) apenas um platô, tanto para Ti-CP quanto para Ti6Al4V. Os platôs indicam elementos constantes de fase (CPE) opostos a resistência à polarização da superfície do titânio.

Figura 8. Gráficos de Ângulo de fase vs. Frequência ■ Ti-CP e ○ Ti6Al4V.

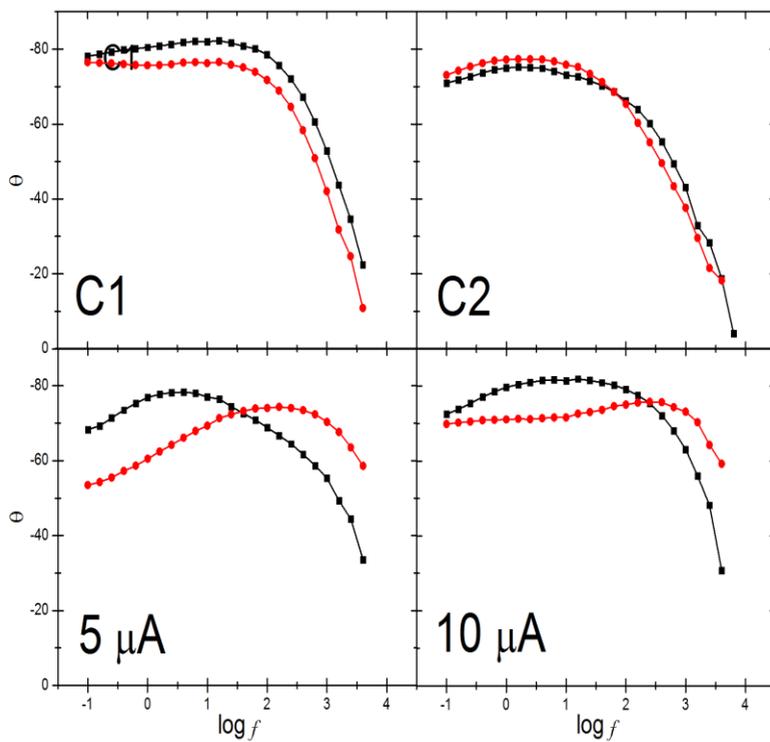


Tabela 2. Valores de OCP, resistência à polarização e capacitância das superfícies de Ti-CP e Ti6Al4V após imersão em solução fisiológica simulada e aplicação de corrente elétrica. C1 – controle sem meio; C2 – controle com meio; estimulação elétrica em 5 μA e 10 μA .

Ti_CP	OCP/mV	$R_p/\text{k}\Omega\text{cm}^2$	$C_{dl}/\mu\text{Fcm}^{-2}$	Ti6Al4V	OCP/mV	$R_p/\text{k}\Omega\text{cm}^2$
C1	-32,46	0,31	20,78	C1	-42,66	0,29
C2	-70,51	0,42	20,34	C2	-79,44	0,58
5 μA	137,3	0,45	9,21	5 μA	388,9	0,11
10 μA	74,43	1,03	6,20	10 μA	496,8	0,65

5.5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados nesta pesquisa demonstraram que a aplicação de corrente elétrica direta e contínua em superfície de titânio modifica a camada de óxidos de titânio na superfície, resultando também em aumento da rugosidade. A adesão de proteínas oriundas do FBS é afetada durante aplicação de corrente elétrica, provavelmente devido à oxidação constante do titânio sob estímulo elétrico, pois as superfícies não estimuladas, ou seja, a camada de óxidos de titânio (filme) passivo, encontrava-se estável. Após aplicação de corrente elétrica, a superfície de titânio apresentou valores de resistência à corrosão significativamente maiores do que as superfícies que não foram eletricamente estimuladas.

A substituição de elementos dentários com implantes tem provado ser uma modalidade de tratamento viável e previsível para tratar pacientes parcial ou totalmente edêntulos. Devido ao aumento da demanda de restaurações implanto-suportadas, é crescente a necessidade de instalar implantes em áreas com quantidade e qualidade óssea comprometidas (Shafer *et al.*, 1995). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para aumentar a quantidade de osso ao redor dos implantes e melhorar a osseointegração. Entre elas: aumento ósseo vertical e horizontal com enxertos autógenos ou substitutos ósseos (Al-Nawas e Schiegnitz, 2014); implantes curtos (Esposito *et al.*, 2009); alteração do desenho e da superfície dos implantes de titânio (Esposito *et al.*, 2014). No entanto, complicações são comuns, como a morbidade da região doadora para enxertos autógenos e a reabsorção de enxertos ósseos.

Resultados preliminares e positivos (Fukada e Yasuda, 1957; Bassett *et al.*, 1974), em relação à aplicação de corrente elétrica em osso, impulsionaram o desenvolvimento de diferentes métodos para a estimulação elétrica, objetivando melhorar o crescimento ósseo. Assim, muitas das desvantagens das outras técnicas poderiam ser eliminadas e a indução elétrica promoveria a osseointegração ao redor dos implantes, permitindo sua instalação em áreas de baixa densidade óssea. No caso de estimulação com corrente direta, a corrente aplicada pode ser contínua ou pulsada (monofásica ou bifásica). Estudos *in vitro* e *in vivo* (Brighton e Hunt, 1986; Friedenberg *et al.*, 1989; Bodamyali *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2009) evidenciam que a corrente direta acelera o processo de formação óssea, provavelmente estimulando

o aumento de osteoblastos pré-existentes e células mesenquimais, que participam da primeira fase desse processo. Além disso, há maior indução de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), propiciando rápida invasão de vasos sanguíneos. Conseqüentemente, há mais nutrientes no meio para as células mesenquimais se diferenciarem (Zipfel *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006).

Um dos primeiros e mais importantes eventos antes do início das atividades celulares - tais como adesão, proliferação, migração e diferenciação celular - é a adsorção das proteínas plasmáticas sobre as superfícies (Feng *et al.*, 2003). Contudo, alguns estudos (Grinnell e Feld, 1982; Yang *et al.*, 2003) sugerem que a adesão celular não é dependente da quantidade de proteína adsorvida na superfície de titânio.

No presente trabalho, a quantidade de proteínas adsorvidas foi determinada com base na diminuição da concentração de proteína da solução após o contato da superfície sólida com o líquido (Lowry *et al.*, 1951; Nakanishi *et al.*, 2001). Observou-se maior adsorção de proteínas nas amostras sem estimulação elétrica (C2) e menor nos subgrupos 10 μA , em ambos os grupos (Ti-CP e Ti6Al4V). Assim, a adsorção de proteínas totais sobre as superfícies de titânio diminuiu durante a aplicação de corrente elétrica e quanto maior a intensidade do estímulo, menor a adsorção proteica.

Williams e Williams (1988), em modelo *in vitro*, descobriram que a adsorção de albumina é relativamente baixa para o óxido de titânio, provavelmente devido à ausência de cálcio sobre a superfície. A adsorção de BSA sobre o titânio é dependente da concentração de proteína, do nível de pH e da presença de íons de cálcio e fosfato (Diana *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 1999). Pesquisadores (Sela *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2009) sugerem que as diferentes propriedades da superfície, como rugosidade, espessura da camada de óxido e energia de superfície, afetam a quantidade de proteínas adsorvidas.

Efetuada o teste FTIR, identificaram-se as bandas de amida I (C=O) e amida II (N-H) nas amostras C2, 5 μA e 10 μA , de ambos os materiais. Feng *et al.* (2003) demonstrou que BSA adsorve quimicamente sobre a superfície de titânio por meio de interações dos grupos C e O e, posteriormente, dos grupos: $(\text{OH})_b$, $(\text{OH})_a$ e $(\text{H}_2\text{O})_{ad}$. O sinal de nitrogênio também é um indicativo da presença de proteína na superfície de titânio (Serro *et al.*, 1997; Serro *et al.*, 2000).

A adsorção das proteínas sobre a superfície dos implantes de titânio podem afetar o mecanismo biológico dos tecidos circundantes e, por conseguinte, repercutir sobre o sucesso do implante (Sela *et al.*, 2007).

As imagens das amostras deste trabalho fornecidas pelo MEV e analisadas por EDS não evidenciaram alterações topográficas nem confirmaram a presença de proteínas adsorvidas na superfície do titânio. O estímulo elétrico na presença de proteínas aumentou os valores de rugosidade R_a determinados por perfilometria. Nos discos de Ti6Al4V, este perfil foi confirmado por AFM. No entanto, no grupo Ti-CP as amostras testes (5 μA e 10 μA) apresentaram menores valores para os parâmetros de rugosidade que o controle (C2), submerso em solução proteica. Essa diferença pode ser explicada pelo reduzido número de amostras e pela diferença de topografia logo após lixamento e polimento, uma vez que a precisão é maior em AFM.

Outra explicação para a dados encontrados para Ti-CP baseia-se nas afirmações de Deligianni *et al.* (2001). Esses autores demonstraram que a adesão e a proliferação celular são dependentes da rugosidade da superfície, assim como a adsorção de proteínas. Também afirmaram que a albumina do soro humano é preferencialmente adsorvida na superfície lisa do titânio, enquanto fibronectina e as proteínas totais ligam-se mais às superfícies ásperas.

Por outro lado, pesquisadores sugerem que a micro e a nano-texturização da superfície de titânio favorece a adesão das células (Jayaraman *et al.*, 2004); influencia a densidade celular e a morfologia e regula a expressão precoce de proteínas ósseas (de Oliveira e Nanci, 2004; Davies, 2005). Além disso, a rugosidade influencia o comportamento dinâmico da molhabilidade e o ângulo de contato das superfícies de titânio modificadas (Lim *et al.*, 2001; Rupp *et al.*, 2004).

No que diz respeito à corrosão, a evolução do OCP mostrou valores mais positivos para os subgrupos testes (5 μA e 10 μA), seguido do subgrupo controle (C1) imerso em solução de PBS, para ambas as ligas de titânio, todavia, com escalas diferentes de potencial. De fato, as superfícies eletricamente estimuladas passaram pelo processo de oxidação o qual alterou a camada de óxidos de titânio sobre o titânio resultando em filme modificado de óxidos de titânio com resistência à corrosão. As superfícies dos subgrupos controle, apresentaram uma

maior tendência às reações de oxidação na superfície de titânio que os grupos testes.

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é considerada uma técnica importante para a investigação do comportamento eletroquímico de filmes passivos. Nesta técnica, a resistência à polarização (R_p) - parâmetro importante para a determinação da resistência à corrosão - pode ser obtida por meio da medição da impedância do sistema superfície/eletrólito sobre uma vasta faixa de frequências (Marino e Mascaro, 2004). Estes dados foram comparados para avaliar a influência da aplicação de corrente elétrica sobre a estabilidade do óxido passivo em meio fisiológico simulado.

Para obter o diagrama de Bode (ângulo de fase vs. frequência), realizou-se a varredura de frequências iniciando com a análise da solução. Em todas as curvas observou-se apenas um elemento constante de fase (CPE), indicando o circuito elétrico de Randle. Os valores de R_p foram obtidos aplicando-se a simulação para este circuito.

O circuito de Randle sugere que o filme passivo de óxido de titânio está presente na superfície das soluções fisiológicas simuladas. Como o teste de EIS foi realizado após aplicação de corrente elétrica, não foi detectado a presença de poros. No entanto, acredita-se que durante a aplicação da corrente elétrica, poderia ser detectado poros, devido à degradação do filme passivo.

Este resultado está em concordância com o diagrama de Bode (impedância vs. frequência) e os valores de capacitância (C_{dl}), uma vez que os subgrupos 5 μA e 10 μA apresentaram valores de R_p mais alto e C_{dl} mais baixo, tanto pra Ti-CP quanto para Ti6Al4V. Isso se deve, provavelmente, ao filme de óxidos de titânio formado em meio com proteínas em maior espessura e propriedades dielétricas resultando em maior resistência à transferência de carga elétrica e, conseqüentemente, maior resistência à corrosão do material. Resultado em concordância com a literatura (Souza *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 20150).

Corroborando com o presente trabalho, pesquisadores relataram que a adição de BSA move significativamente os valores de OCP para um potencial negativo (Cheng e Roscoe, 2005). Segundo Contu *et al.* (2002), essa adição influencia na corrosão do titânio, aumentando sua resistência à polarização (R_p), provavelmente devido à capacidade das

proteínas de se ligarem aos íons de oxigênio livres na interface metal/óxido (Contu *et al.*, 2002).

Maior resistência à corrosão é importante para aumentar a biocompatibilidade. A liberação de íons metálicos e/ou partículas tóxicas por meio da corrosão ou processos de desgaste pode induzir a cascata inflamatória; por conseguinte, reduzir a biocompatibilidade e causar dano aos tecidos. Os íons vanádio e alumínio, liberados da superfície Ti6Al4V, estão associados a graves problemas de saúde, reações adversas dos tecidos e desordens neurológicas (Jeong *et al.*, 2001). Portanto, é importante alterar a superfície do titânio de forma eficaz, prevenindo a liberação de íons prejudiciais e contribuindo para uma melhor resposta biológica.

5.6. CONCLUSÃO

Considerando as limitações do presente estudo *in vitro* sobre a influência de estímulo elétrico sobre a superfície de titânio, conclusões podem ser descritas como segue:

- Foram encontradas alterações morfológicas – maior rugosidade - em superfície de titânio após estimulações elétricas;
- Foi encontrada uma relação inversamente proporcional entre corrente elétrica aplicada e adsorção de camada à base de proteínas: quanto maior a intensidade de corrente elétrica menor a adsorção de proteínas;
- Foi observado maior tendência às reações de oxidação e maior resistência à corrosão nas superfícies de titânio estimuladas eletricamente;
- Os resultados desse trabalho sugerem que estudos podem ser realizados variando a corrente elétrica e seu método de aplicação, assim como o meio de imersão (simulação).

REFERÊNCIAS

Aaron, R.; Ciombor, D.; Wang, S.; Simon, B. Clinical biophysics: the promotion of skeletal repair by physical forces. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1068:513-31.

Andrade JD, Hlady V. Protein adsorption and materials biocompatibility-a tutorial review and suggested hypotheses. *Advances in Polymer Science* 1986; 79: 1-63.

Aro H, Eerola E, Aho AJ, Penttinen R. Electrostimulation of rat callus cells and human lymphocytes in vitro. *J Orthop Res*. 1984;2(1):23-31.

Barquero Cordero, Ernesto. Avaliação da formação óssea em implantes usinados de titânio estimulados eletricamente: estudo em Cães. 2012. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração Implantodontia) – Programa de Pós- Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia,

Barquero Cordero, Ernesto. Avaliação do torque de remoção na interface osso-implante promovido por estímulo elétrico em implantes dentários: estudo em cães. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Bassett CA, Pawluk RJ, Pilla AA. Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields. A surgically noninvasive method. *Ann N Y Acad Sci*. 1974; 238: 242-262.

Bilal Al-Nawas, Eik Schiegnitz. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone – a systematic review and meta-analysis. *Eur J Oral Implantol* 2014;7(Suppl2):S219–S234.

Bodamyali T, Kanczler JM, Simon B, Blake DR, Stevens CR. Effect of faradic products on direct current- stimulated calvarial organ culture calcium levels. *Biochem Biophys Res Commun* 1999,264:657–661.

Bordji, K., Jozeau, J.Y., Mainard, D., Payar, E., Nether, P., Stucky, T., Hage M. *Biomaterials* 17 (1996) 929.

Brighton CT, Hunt RM (1986). Ultrastructure of electrically induced osteogenesis in the rabbit medullary canal. *J Orthop Res* 4:27-36.

Broggini et al., Persistent acute inflammation at the implant–abutment interface, *J. Dent. Res.* 82 (2003) 232.

Buch, F.; Albrektsson, T; Herbs, T. Direct current influence on bone formation in titanium implants. Abstract. *Biomaterials*. 1984

Nov;5(6):341-6.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini J, Fox C, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed Mater Res.* 1991;25:889-902.

Cheng, Xiaoliang and Roscoe, Sharon. Corrosion behavior of titanium in the presence of calcium phosphate and serum proteins. *Biomaterials.* 2005, Vol. 26, pp. 7350-7356.

Contu F, Elsener B, Hohni H. Characterization of implant materials in fetal bovine serum and sodium sulfate by electrochemical impedance spectroscopy. I. Mechanically polished samples. *J Biomed Mater Res* 2002;62:412–21.

Cruz, Souza, Henriques et al. Tribocorrosion and Bio-Tribocorrosion in the Oral Environment: The Case of Dental Implants. In: *Biomedical Tribology.* Nova Science Publishers 2011. 01-33.

Davies, J.E. (2005) Understanding Peri-Implant Endosseous Healing. Re-issued from: *Journal of Dental Education* 67, Number 8, August 2003.

de Oliveira, P.T. & Nanci, A. (2004) Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 25: 403–413.

Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 2001; 22: 1241-1251.

Diana T, Wassell H, Embery G. Adsorption of bovine serum albumin on to titanium powder. *Biomaterials* 1996;17:859–64.

Elias, C.N., *et al.* Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal

torque. *J. Of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials I.* 2008; 234–242.

Eriksson, C., Nygren, H. & Ohlson, K. (2004) Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. *Biomaterials* 25: 4759–4766.

Esposito M, Ardebili Y, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 7.

Feng, J Weng, B.C Yang, J.Y Chen, J.Z Zhao, L He, S.K Qi, X.D Zhang. Surface characterization of titanium and adsorption of bovine serum albumin. *Materials Characterization*, Volume 49, Issue 2, September 2002, 129–137

Friedenberg, Z. B.; Brighton, C. T.; Michelson, J. D.; Bednar, J.; Schmidt, R.; Brockmeyer, T. The effects of demineralized bone matrix and direct current on an "in vivo" culture of bone marrow cells. *J Orthop Res.* 1989;(7):22-7.

Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J PhysSoc Japan.* 1957; 12: 1158-69.

Griffin M, Bayat A. Electrical stimulation in bone healing: critical analysis by evaluating levels of evidence. *Eplasty.* 2011; 11: e34.

Grinnell F, Feld MK. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biological Chem* 1982;257:4888–4893.

Healy KE, Ducheyne P. Hydration and preferential molecular adsorption on titanium in vitro. *Biomaterials* 1992;13:553–61.

Hey, J., Beuer F, Bense, T., Boeckler, A. Single crowns with CAD/CAM fabricated copings from titanium: 6-years clinical results, *J. Prosthet. Dent* 112 (2) (2014) 150–154.

Hu, X.N., Yang, B.C. Conformation change of bovine serum albumin induced by bioactive titanium metals and its effects on cell behaviors. *J Biomed Mater Res Part A: 102A: 1053–1062, 2014.*

Jayaraman, M., Meyer, U., Buhner, M., Joos, U. & Wiesmann, H.P. (2004) Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials 25: 625–631.*

Jeong YH, Choe HC, Brantley WA. Corrosion characteristics of anodized Ti-(10-40 wt%) Hf alloys for metallic bio- materials use. *J Mater Sci Mater Med 2011;22:41-50.*

Jimbo R, Ivarsson M, Koskela A, Sul YT, Johansson CB. Protein Adsorption to Surface Chemistry and Crystal Structure. *Modification of Titanium Surface J Oral Maxillofac Res 2010 (Jul-Sep);1(3)*

Kazuhiro Nakanishi, Takaharu Sakiyama, Andkoreyoshi Imamura. On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering Vol. 91, No. 3, 233-244. 2001*

Kim IS, Song JK, Zhang YL, Lee TH, Cho TH, Song YM. Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblast. *Biochim Biophys Acta. 2006. 1763:907 – 916.*

Korenstein, R.; Somjen, D.; Fischler, H.; Binderman, I. Capacitative pulsedelectric stimulation of bone cells: induction of cyclic-AMP changes and DNA synthesis, *biochim. Biophys. Acta 803. 1984:302-7.*

Kyul Kim, Bo-Ah Lee, Xing-Hui Piao, Hyun-Ju Chung, Young-Joon Kim. (2013) Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface. *J Periodontal Implant Sci 43:198-205.*

Lars Liljas, Per Lundahl, Stellan Hjertien. Selective solubilizat[on with tween 20 of proteins from water-extracted human erythrocyte membranes analysis by gel electrophoresis in dodecylsulfate and in tween 20. *Biochimica et biophysica acta, 352 (1974) 327-337*

Lim, Y.J., Oshida, Y., Andres, C.J. & Barco, M.T. (2001) Surface

characterizations of variously treated titanium materials. *Oral & Maxillofacial Implants* 16: 333–342.

Lossdorfer, S., Schwartz, Z., Wang, L., Lohmann, C.H., Turner, J.D., Wieland, M., Cochran, D.L. & Boyan, B.D. (2004) Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal of Biomedical Materials Research A* 70: 361–369.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265-275

MacDonald DE, Deo N, Markovic B, Stranick M, Somasundaran P. Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 2002; 23: 1269-1279.

MacDonald, D.E., Rapuano, B.E., Deo, N., Stranick, M., Somasundaran, P. & Boskey, A.L. (2004) Thermal and chemical modification of titanium–aluminum–vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment. *Biomaterials* 25: 3135–3146.

Manaranche, C., Hornberger, H. A proposal for the classification of dental alloys according to their resistance to corrosion, *Dent. Mater.* 23 (2007) 1428–1437.

Manda, M.G., Psyllaki, P.P., Tsipas, D.N., Koidis, P.T. Clinical device-related article observations on an in-vivo failure of a titanium dental implant/abutment screw system: a case report, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 89B (2009) 264–273.

Marco Esposito, Maria Gabriella Grusovin, Pietro Felice, Georgios Karatzopoulos, Helen V Worthington, Paul Coulthard .The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants— a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol* 2009;2(3)167–184.

Marino, C.E.B, Mascaro, L.E. EIS characterization of a Ti-dental implant in artificial saliva media: dissolution process of the oxide barrier, *J. Electroanal. Chem.* 568 (2004) 115–120).

Niinomi, M. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 4 (2003) 445–454.

Oliva, Fabiana Y., Cámara, Osvaldo R. and Avalue, Lucía B. Adsorption of human serum albumin on electrochemical titanium dioxide electrodes: Proteins-oxide surface interaction effects studied by electrochemical techniques. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2009, Vol. 633, pp. 19-34.

Pan, C.J., Hou, Y.H., Zhang B.B. and Zhang, L.C.. Fabrication of anticoagulation layer on titanium surface by sequential immobilization of poly (ethylene glycol) and albumin. *Bio-Medical Materials and Engineering* 24 (2014) 781–787

Ponsonnet *et al.*, 2003; 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 & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* 2003; 23: 551-560.

Puleo, D. A.; Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials.* 1999, 20: 2311–2321.

Rupp, F., Scheideler, L., Rehbein, D., Axmann, D. & Geis-Gerstorfer, J. (2004) Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials* 25: 1429–1438.

Sang-Woon Lee, Byung-Dong Hahn, Tae Yeon Kang, Myung-Jin Lee, Je-Yong Choi, Min-Keun Kim, and Seong-Gon Kim. Hydroxyapatite and collagen combination-coated dental implants display better bone formation in the peri-implant area than the same combination plus bone morphogenetic protein-2-coated implants, hydroxyapatite only coated implants, and uncoated implants. *J Oral Maxillo- fac Surg* 2014. 53-60.

Sela MN, Badihi L, Rosen G, Steinberg D, Kohavi D. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. *Clin. Oral Impl. Res.* 18, 2007; 630–638

Serro AP, Fernandes AC, Saramago B, Lina J, Barbosa MA. Apatite deposition on titanium surfaces - the role of albumin adsorption. *Biomaterials* 1997;18:963 – 8.

Serro AP, Fernandes AC, Saramago B. Calcium phosphate deposition on titanium in the presence of fibronectin. *J Biomed Mater Res* 2000;49:345 – 52.

Shafer, D. M.; Rogerson, K.; Norton, L.; Benneth, J. The effect of electrical perturbation on osseointegration of titanium dental implants: a preliminary study. *J Oral Maxillofacial Surgery.* 1995;53:1063-8.

Shayesteh, Y. S.; Eslami, B.; Dehghan, M. M.; Vaziri, H.; Alikhassi, M.; Mangoli, A. et al. The effect of a constant electrical field on osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: a preliminary study. *Journal of Prosthodontics.* 2007 Sep- Oct;16(5):337-42.

Shigino, T.; Ochi, M.; Hirose, Y.; Hirayama, H.; Sakaguchi, K. Enhancing osseointegration by capacitively coupled electric field: a pilot study on early occlusal loading in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16:841-50.

Shigino, T.; Ochio, M.; Sakaguchi, H.; Sakaguchi, K.; Nakade, O. Application of capacitively coupled electric field enhances periimplant osteogenesis in the dog mandible. *Int J Prosthodontic.* 2000;13:365-72.

Song, J.; Tae H. Cho; Hui Pan; Yoon M. Song; In S. Kim; Tae H. Lee; Soon J. Hwang; Sung J. Kim. An Electronic Device for Accelerating Bone Formation in Tissues Surrounding a Dental Implant. *Bioelectromagnetics* 2009; 30: 374 – 384.

Souza, J.C.M.; Barbosa, S.L.; Ariza, E.; Celis, J.-P.; Rocha, L.A. Simultaneous degradation by corrosion and wear of titanium in artificial saliva containing fluorides, *Wear* 292 (2012) 82–88.

Souza, J.C.M.; Barbosa, S.L.; Ariza, E.; Henriques, M., Teughels, W.; Ponthiaux, P.; Celis, J.-P; Rocha, L.A. How do titanium and Ti6Al4V corrode in fluoridated medium as found in the oral cavity? An in vitro study. *Materials Science and Engineering C* 47 (2015) 384–393.

Thomas F. Keller, Jörg Reichert, Tam Pham Thanh, Ranko Adjiski, Lothar Spiess, Liga Berzina-Cimdina, Klaus D. Jandt, Jörg Bossert. Facets of protein assembly on nanostructured titanium oxide surfaces. *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 5810–5820.

Thomas KA, Cook S. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J. Biomed Mater Res.* 1985;19:875-901.

Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontics applications: a review of the literature. *Quintessence Int* 1996;27:401-8.

Wilke HJ, Claes L, Steinemann S. The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone. 1990. In: Heimke, G., Soltész, U. & Lee, A.J.C., eds. *Clinical Implant Materials (Advances in Biomaterials No. 9)*, 309–314. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV. In: Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann S. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J. Dental Res.* 2004;83:529-533.

Williams, R.L. and D.F.Williams.1988."The Characteristics of Albumin Adsorption on Metal Surfaces," *Biomaterials*, pp. 206-212.

Xiaohua Yu, Haibo Qu, David A. Knecht, Mei Wei. Incorporation of bovine serum albumin into biomimetic coatings on titanium with high loading efficacy and its release behavior. *J Mater Sci: Mater Med* (2009) 20:287–294.

Yang YZ, Cavin R, Ong JL. Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003; 67A: 344- 349.

Zeng H, Chittur KK, Lacefield WR. Analysis of bovine serum albumin

adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials* 1999;20:377–84.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74A:49–58

Zipfel GJ, Guiot BH, Fessler RG. 2003. Bone grafting. *Neuro- surgical Focus* 14:1–8.

6 ARTIGO EM INGLÊS

ELECTRICAL CURRENT STIMULATION ON TITANIUM SURFACES IN PHYSIOLOGICAL SIMULATED MEDIUM.

6.1 ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the electrical stimulation influence on titanium surface immersed in a physiological simulated environment.

Materials and Methods: Commercially pure titanium grade IV and Ti6Al4V alloy with dimensions of 8 x 15 mm were wet ground on SiC abrasive papers down to 2500 Mesh and polished with alumina (1.0; 0.5 and 0.3 μm). After grinding, the samples were cleaned with 70% ethanol and distilled water for 10 minutes under ultrasonic bath. After sterilized, the samples were connected to a potentiostat, which induced and monitored direct and constant electric current on the surface. The titanium samples were placed in an electrolytic cell containing electrolyte medium and divided into 2 groups: Ti-CP and Ti6Al4V, further divided according to electric current application and electrolyte means: C1 (0 μA without medium); C2 (0 μA immersed in DMEM and FBS); 5 μA to 10 μA (immersed in DMEM and FBS). After electrical stimulation, proteins adsorption was quantitative evaluated by Lowry and FTIR tests. Titanium surfaces were characterized by potential electrochemical corrosion tests and impedance and topographic analysis from atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM).

Results: FTIR analysis, showed the presence of amide energy bands characteristic in all samples immersed in DMEM + FBS indicating the presence of proteins. By the Lowry method the greatest amount of total protein adsorbed was C2 subgroups ($p < 0.05$). Regarding morphological change, the profilometry testing showed higher Ra values for pure titanium samples submitted to 10 μA ($p < 0.05$). Ti6Al4V surfaces had the highest Ra values for 5 μA , but no statistical difference with subgroup 10 μA ($p > 0.05$). SEM images revealed no differences between the groups. When submitted to electrochemical tests, test samples (5 μA and 10 μA) showed greater corrosion resistance.

Conclusion: Was found electrochemical and topographical changes in Ti-CP and Ti6Al4V surfaces after electrical stimulation in physiological simulated environment.

Keywords: Direct current stimulation, Corrosion, Titanium, Electrochemistry.

6.2 INTRODUCTION

Therapy with implants for replacing dental elements in partially or fully edentulous patients has become a well-documented and scientifically accepted technique (Elias *et al.*, 2008). For the dental implant to be functional is needed osseointegration. The required time for a titanium implant to become functional is reported in the literature as 12 weeks in maxilla and 6 weeks in mandible, approximately. Osseointegration depends mainly on the healing capacity of each individual; the implants surface treatment and the surgical technique used. New techniques and implants surfaces have been developed for accelerating bone formation and consequently reduce osseointegration time. (Puleo *et al.*, 1999).

Commercially pure titanium has become one of the most used biomaterials for its desirable properties, such as high corrosion resistance and biocompatibility associated with high mechanical tensile strength (400-550 MPa) and low density (4.5 g cm⁻³). Corrosion resistance and biocompatibility are the result of a compact film of titanium oxide mainly composed of TiO₂ with a thickness of 2 to 20 nm and highly protective, when in contact with tissue fluids. (Wang and Fenton, 1996; Niinomi, 2003). Titanium alloys also exhibit excellent corrosion resistance and biocompatibility, among which the most widely used for biomedical applications is Ti-6Al-4V (Niinomi, 2003).

However, a reaction of the titanium surface with the oral environment and contact with physiological fluids during performance occurs as proven by several studies (Cruz, Souza, Henriques *et al.*, 2011). The metal ions released during the corrosion can induce adverse biological reactions, as gingival inflammation (Contu *et al.*, 2002; Manaranche and Hornberger, 2007) and peri-implant, alveolar bone loss around dental implants (Broggini *et al.*, 2003), as well as allergic reactions, local necrosis and many other health problems (Cruz, Souza, Henriques *et al.*, 2011). In addition, researchers (Manda *et al.*, 2009;

Hey *et al.*, 2014) have shown that titanium can cause corrosion of cosmetic changes and compromise the physical properties.

In order to improve metallic biomaterials behavior, its biocompatibility and also their mechanical and physicochemical properties, many studies have focused on knowledge and improvement of surface treatments (Thomas and Cook, 1985; Wilke *et al.*, 1990; Buser *et al.*, 1991; Bordji *et al.*, 1996; Jimbo *et al.*, 2003; Ponsonet *et al.*, 2003; Sela *et al.*, 2007; Hu and Yang, 2014).

Protein adsorption on titanium oxide surface is important for the implant osseointegration, since adjacent tissue reorganization depends on the adsorption that occurs from the liquid present between the implant and the autogenous tissue (Healy and Ducheyne 1992). Wettability, surface energy and chemical factors can be considered relevant for protein adsorption characteristics determination on metal surfaces (Deligianni *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2004). Immediately after hydration layer formation, blood proteins start to agglomerate on the surface (Puleo *et al.*, 1999; MacDonald *et al.*, 2002). Additionally, surface microstructure and roughness strongly influence wettability of titanium implants surfaces during initial contact with the host. This may have consequences for initial biological response of plasma protein adsorption, expression of bone proteins and therefore induce host cellular responses (Deligianni *et al.*, 2001; de Oliveira and Nancy, 2004; Lossdorfer *et al.*, 2004; Rupp *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2013). Thus, proteins adsorption plays a key role on implant integration into the body. It is a dynamic process involving non-covalent interactions, such as hydrophobic and electrostatic interactions, hydrogen bonding and Van der Waals forces (Hlady and Andrade, 1986).

In order to accelerate osseointegration process, there are biophysical alternatives such as mechanical, sonic and electrical in addition to biochemical osteoinductive therapies (Aaron *et al.*, 2006). The first studies on the effect of load or strain on the electrical properties of bone showed that the compressive stress causes a negative potential placed across the electrodes, leading to bone resorption, while the tensile stress has a positive potential, causing the bone growth (Fukada and Yasuda, 1957; Bassett *et al.*, 1974). These results led to the development of various methods for bone electrical stimulation. An invasive method, and most commonly used, is the direct current

stimulation (DC); on the other hand, non-invasive ways to stimulate bone growth are inductive stimulus (IS) and capacitive stimulus (CS) (Cochran, 1972).

Researchers have shown that electrical stimulation, either by CD, generating electric field (IS) or CS, improved bone healing (Buch, Albrektsson and Herbs, 1984; Griffin and Bayat, 2011), cell proliferation (Aro *et al.*, 1984), release of prostaglandin E (Koreinstein *et al.*, 1984) and extracellular matrix synthesis (Frienderberg *et al.*, 1989). In vivo studies have also shown that electrical stimulation promotes osteogenesis (Shigino *et al.*, 2000), better osseointegration (Shigino *et al.*, 2001) and provides better bone implant contact (Shayesteh *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009; Barqueiro *et al.*, 2012). However, Shafer *et al.* (1995) concluded that electric current application in low amperage (7,5 μ A) has no positive effect on bone healing. Barqueiro *et al.* (2010) demonstrated that electrical stimulation did not affect removal torque values.

Considering the importance of surface changes on titanium implants in the quality and success of osseointegration and little understanding of the effect of electrical stimulation on titanium in the presence of proteins, it is necessary tests, *in vitro*, to evaluate different parameters separately. In this sense, the objective of this in vitro study was to evaluate the effect of different electric current (5 uA and 10 uA) in commercially pure titanium surface grade IV and Ti6Al4V immersed in simulated physiological environment.

6.3 MATERIALS AND METHODS

6.3.1 Sample preparation

Cylindrical samples (8x15mm) were cut from bars of commercially pure titanium grade IV and Ti6Al4V alloy (BiorAcnis, Brazil). The samples were wet ground on SiC abrasive papers down to 1200 Mesh. After grinding, the samples were cleaned in 70% ethanol and distilled water for 10 min using an ultrasonic bath. Then, samples were autoclaved for 20 min and stored in a desiccator for 24 hours.

6.3.2 Electric current density application

The application of electric current was performed using galvanostatic test. We used an electrochemical cell designed and fabricated in order to keep the solution unaltered and allow insertion of the electrodes. The working electrode (WE) consisted of the samples mentioned above, that has an electrical contact with copper wire. The reference electrode (RE) was a silver/silver chloride saturated KCl solution (Ag / AgCl_{sat}) and the counter electrode (CE) was a platinum plate. Galvanostatic tests were performed in a PalmSens potentiostat (Palm Instruments BV, Netherlands) coupled to a computer that ran the PStTrace 4.4 software for acquisition and analysis of data. We used a volume of 5000 μ L of working solution consisting of Medium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Invitrogen) + antibiotics (1% penicillin/streptomycin) (Sigma-Aldrich), pH 7.4. Electrochemical cells and electrodes were sterilized with ultraviolet light for 30 min before performing electrochemical measurements. After sterilization, the whole apparatus was moved to a kiln at 36 ⁰C with humidity and CO₂ concentration controlled.

The samples were divided into two groups, depending on the biomaterial used: Ti-CP and Ti6Al4V, for carrying out the assays CP. The division into subgroups was based on the amount of current that would be applied to WE. Were applied different electric current densities for 3 hours (Yang *et al.*, 2003) in each subgroup: C1 (0 μ A - no medium), C2 (0 μ A - presence of medium), 5 μ A and 10 μ A. The resulting potential, due to the potential difference between the working and reference electrodes, was monitored every 30 seconds during the tests.

Ti-CP:	C1 (0 μ A – no medium)
	C2 (0 μ A – presence of medium)
	5 μ A
	10 μ A
Ti6Al4	C1 (0 μ A – no medium)
	C2 (0 μ A – presence of medium)
	5 μ A
	10 μ A

6.3.3 Protein adsorption analysis

6.3.3.1 Determination of total proteins by colorimetric test

For analysis, modified Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) and UV-VIS spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus 384, USA), at a wavelength of 750nm, was used.

6.3.3.2 Quantitative analysis in real time, FT-IR spectroscopy (Fourier Transform Infrared)

Titanium disks were washed with a phosphate buffer solution (PBS) and fixed in 2.5% glutaraldehyde for 1 hour. Then, the samples were dehydrated in graduated ethyl alcohol solutions (30 - 100%) for 15 minutes each. After drying in a kiln at 30 °C for 12 hours, infrared absorption spectrum using FT-IR in attenuated total reflectance mode (ATR) (Bruker Tensor 27) was obtained. Samples were analyzed by transmittance mode in the region between 4000-600 cm^{-1} , due to the accumulation of 32 scans with a resolution of 4 cm^{-1} .

As literature reports (Yu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2014) the spectrum of bovine serum albumin (BSA) shows two bands of vibrational absorption at about 1700-1600 cm^{-1} and 1550-1500 cm^{-1} that can be assigned to C=O amide I stretching mode and N-H amide II bending mode, respectively.

6.3.4 Titanium surface analysis

6.3.4.1 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The samples were prepared as described in section 6.3.3.2 and subsequently coated with a layer of gold-palladium. We used the SEM (JEOL JSM-6390LV) with source of tungsten electrons, secondary electron detector and the tensions between 10 and 15 kV. Five areas were obtained at different magnifications (x100, x500, x1000, x2000, x3000) in the samples of each group. Samples were analyzed by X-ray spectroscopy energy dispersive (EDS), to observe its chemical composition.

6.3.4.2 Perfilometry

Titanium disks were washed with sterile distilled water and proteins were extracted with 1% Tween 20 in distilled water, heated for 30 min at 100 °C (Liljas, *et al.*, 1974). Drying was performed in an incubator at 30 °C for 12 hours. Thereafter, the surface roughness (two samples of each group) was measured by an optical profilometer (Bruker DektakXT, USA) and five areas of 200µm on each disc was obtained. The average roughness (R_a) maximum total roughness (R_t) values were calculated.

6.3.4.3 Atomic Force Microscopy (AFM)

Samples were prepared as described in section 6.3.4.2 and analyzed by AFM (Nanosurf FlexAFM EasyScan 2 Controller, Switzerland), operating in tapping - intermittent contact, tip NCLR model (radius <10 nm), resonant frequency of 190 kHz, spring constant 48 N m⁻¹ sweep speed line s⁻¹. The images were processed and R_a and root mean square (RMS) values were calculated by the AFM software WSxM4.0. (Nanotec Electronica, Spain) from the area of 13µm x 13µm on the titanium surface.

6.3.4.4 Open Potential Circuit (OCP) and Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)

The tests were performed after CP assays. OCP was measured for 30 min, followed by EIS. EIS tests were performed in open circuit, with a frequency sweep in the range of 10-2 Hz to 105 Hz with sine wave amplitude of 10 mV and frequency scanning frequency of 5/decade. These tests were performed with a potentiostat Voltalab PGZ100 (Radiometer Copenhagen, Denmark) coupled to a computer using the Voltmaster 4.0 software for analysis and data processing. Was used the same electrochemical cell with the same electrode arrangement mentioned in section 6.3.2, at room temperature. For each sample, this sequence was completed three times.

6.3.5 Statistical analysis

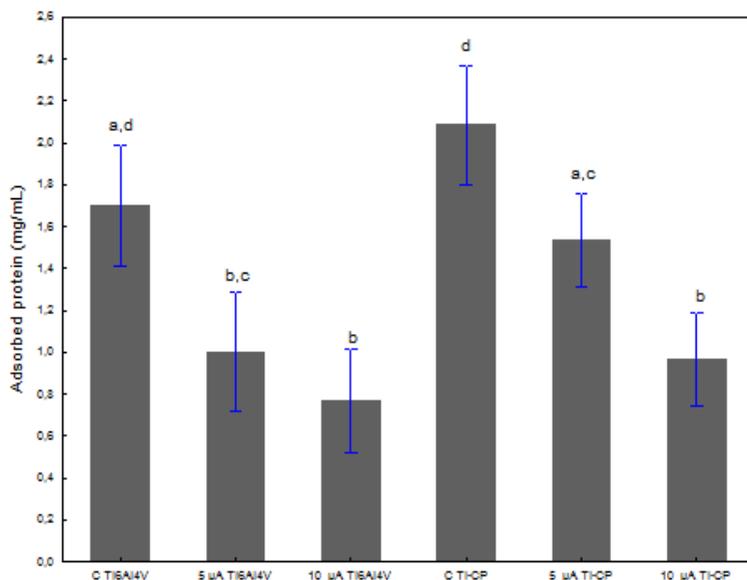
Analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey's test for multiple comparisons was performed (STATISTICA, Statsoft Inc, USA). And a significance level of 5% ($p < 0.05$) was adopted.

6.4 RESULTS

6.4.1 Protein adsorption

The results of total protein quantification by the Lowry method are shown in Figure 1.

Figure 1. Total protein concentration adsorbed on Ti6Al4V and Ti-CP surfaces: C (control in the presence of medium) 5 μ A and 10 μ A.



Considering proteins adsorption on Ti-CP group, statistical differences were found between all subgroups: control (20%), 5 μ A (15%) and 10 μ A (9%). On the other hand, Ti6Al4V group shows significant difference between the control subgroups (16%), 5 μ A (10%) and 10 μ A (7%). however, subgroups tests show no statistical difference between them. There was greater proteins adsorption in subgroups controls: Ti6Al4V and Ti-CP, with values of 1.70 ± 0.08 mg / mL and 2.90 mg / mL ± 0.01 , respectively, with no significant difference between them. Thus, the direct electrical current application presented an effect of inhibiting the total protein adsorption on titanium surfaces.

The results of protein adsorption on titanium surfaces by ATR-FTIR are shown in Fig. 2 and 3.

Figure 2. ATR-FTIR analysis of Ti-CP samples: C2, 5 μ A and 10 μ A.

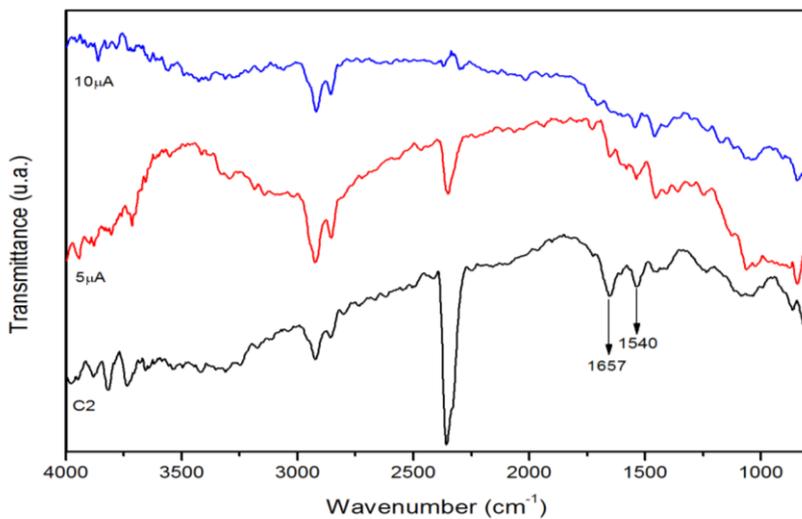
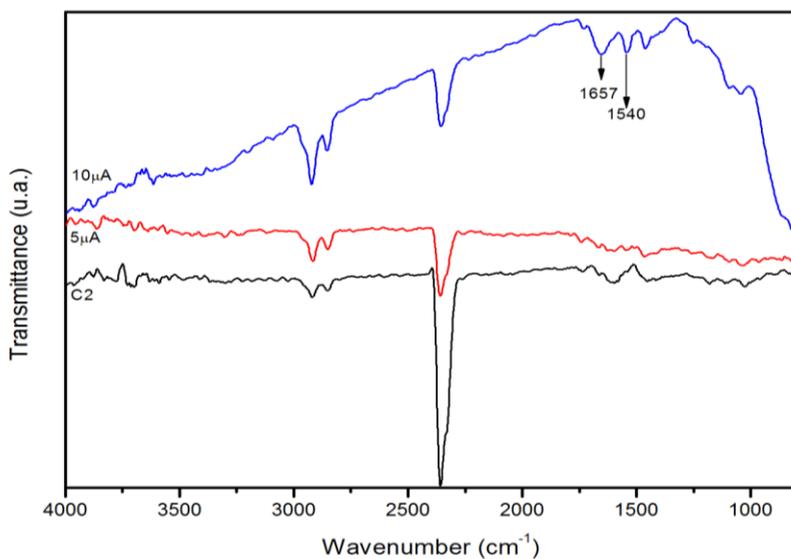


Figure 3. ATR-FTIR analysis of Ti6Al4V samples: C2, 5 μ A and 10 μ A.



As seen in Figures 2 and 3, two bands were observed in 1657 cm^{-1} and 1540 cm^{-1} in both samples (C2, $5\ \mu\text{A}$ and $10\ \mu\text{A}$) Ti-CP and Ti6Al4V group samples. These results indicate the presence of C=O and NH, suggesting adsorption of BSA present in FBS on titanium surface.

6.4.3 Topographic analysis

Images obtained by Scanning Electron Microscopy (SEM) revealed the surface morphology of the samples: Ti-CP and Ti6Al4V groups after immersion in simulated physiological environment and electrical current application. In Figure 4, you cannot differentiate whether there were changes on the Ti-CP surfaces after electric current application considering this type of analysis and expansion. The same happened to the Ti6Al4V surfaces.

Figure 4. Images obtained by SEM showing the surface topography of the Ti-CP discs after immersion in physiological medium and electrical stimulation. (A) C2 - control with medium, (B) $5\ \mu\text{A}$ and (C) $10\ \mu\text{A}$. Secondary electrons method, original magnification x 2,000 and voltage of 15 kV.

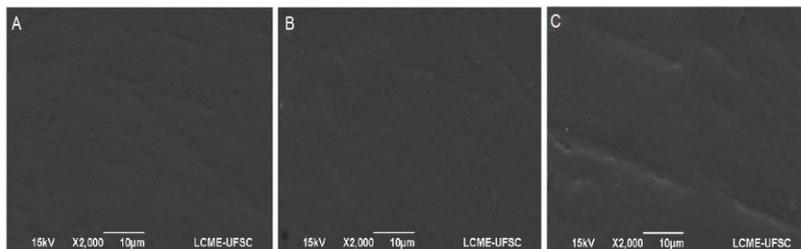
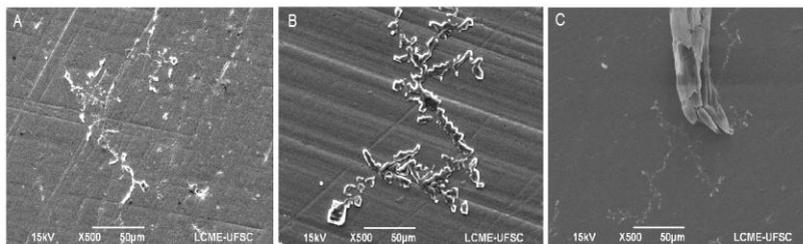
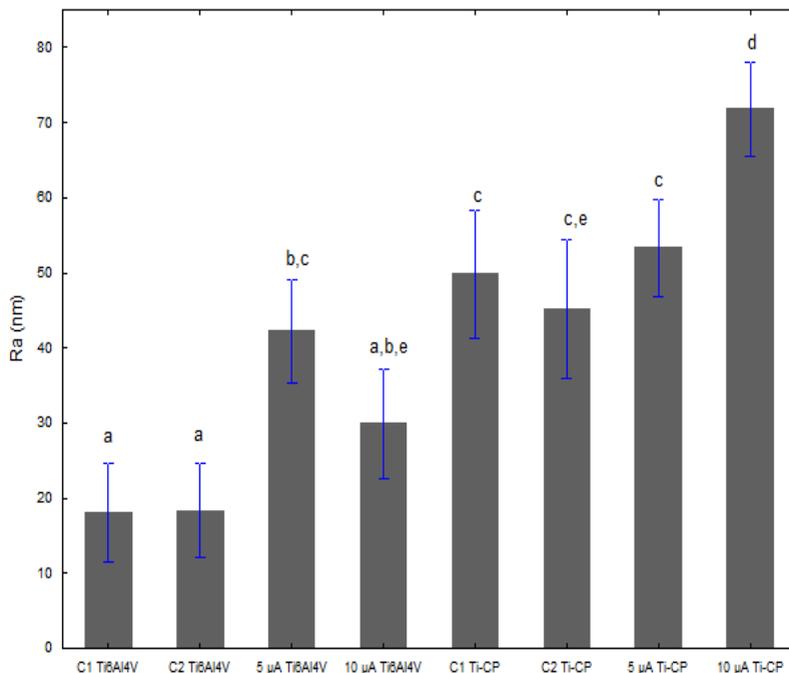


Figure 5. Images obtained by SEM showing the surface topography of the Ti6Al4V discs after immersion in physiological medium and electrical stimulation. (A) C2 - control with medium, (B) $5\ \mu\text{A}$ and (C) $10\ \mu\text{A}$. Secondary electrons method, original magnification x 500 and voltage of 15 kV.



R_a values for Ti-CP and Ti6Al4V surfaces are shown in Figure 6.

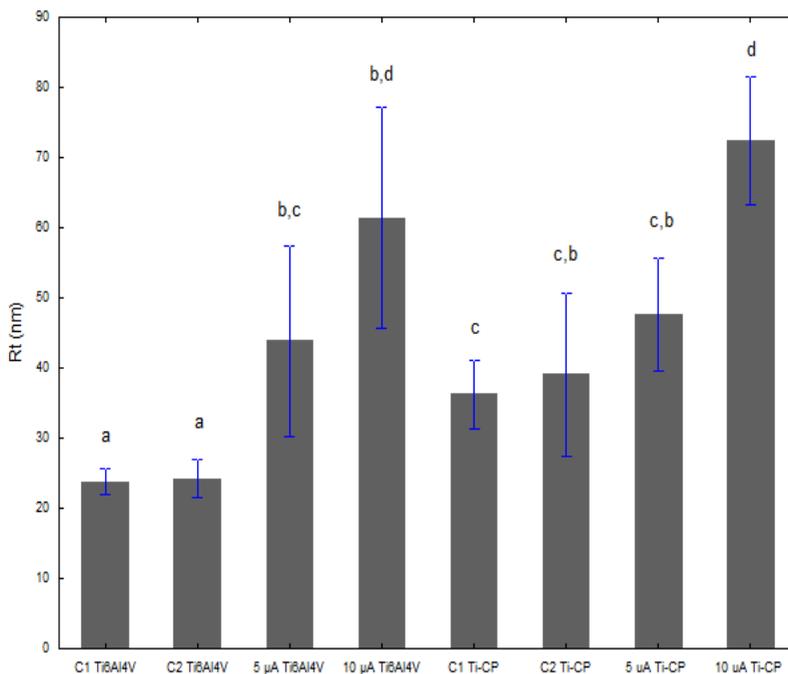
Figure 6. R_a values for Ti6Al4V and Ti-CP samples. Statistically significant data for $p < 0.05$.



Ti-CP group presents statistical difference between the subgroup 10 μ A (71.82 ± 16.98 nm) and the others. While, Ti6Al4V group presents statistical difference between the subgroups control (C1 and C2) and 5 μ A. However, subgroups tests show no statistical difference between them. The controls (C1 and C2) of Ti6Al4V and Ti-CP groups are statistically significant, as well as 10 μ A and 10 μ A Ti6Al4V Ti-CP, unlike the subgroups 5 μ A Ti6Al4V and 5 μ A Ti-CP.

R_l values for Ti-CP and Ti6Al4V surfaces are shown in Figure 7.

Figure 7. Rt values for Ti6Al4V and Ti-CP samples. Statistically significant data for $p < 0.05$.



Ti-CP group presents statistical difference between the subgroup 10 μA (72.38 ± 11.86 nm) and others. Unlike the results shown in Fig. 6, there is a statistically significant difference between control (C1 and C2) and tests (5 μA e 10 μA) subgroups of Ti6Al4V group. Moreover, when comparing the subgroups: controls (C1 and C2), 5 μA and 10 μA of Ti6Al4V and Ti-CP groups are observed statistical difference between only the controls. The results suggest a greater influence of the application of electric current intensity of 10 μA in pure titanium surface.

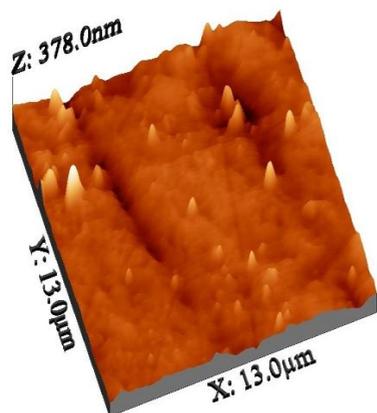
Figures 8 and 9 shows three-dimensional images of titanium surface disks acquired by AFM after proteins adsorption and extraction assays. Table 1 identifies R_a and RMS values: C2 Ti-CP sample has the highest value for its group, while 10 μA TiAl4V sample has the highest value for both groups. Probably was contaminated by waste layer during adsorption and removal of the protein layer.

Table 1. Ra and RMS values for the samples analyzed by AFM

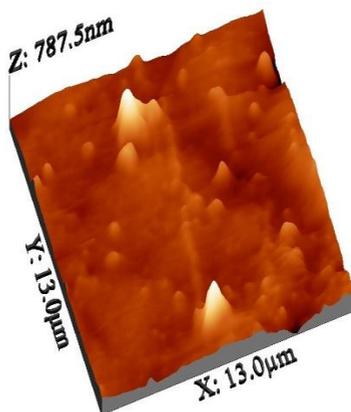
Ti-CP	RMS (nm)	Ra (nm)
C1	27.3843	18.7820
C2	65.1580	41.2877
5 μ A	21.4554	15.3891
10 μ A	48.0409	33.1642
Ti6Al4V	RMS (nm)	Ra (nm)
C1	15.2641	11.2960
C2	23.4282	16.1540
5 μ A	35.4121	19.1324
10 μ A	75.1129	51.8034

Figure 8. Shows AFM images the surface topography of Ti-CP discs (A) C1; (B) C2; (C) 5 μ A and (D) 10 μ A.

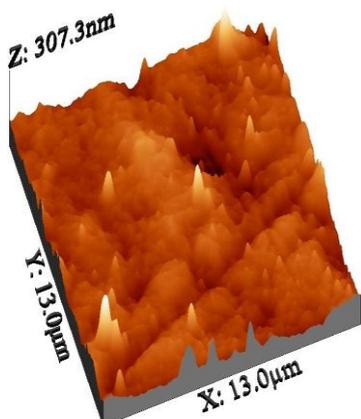
A



B



C



D

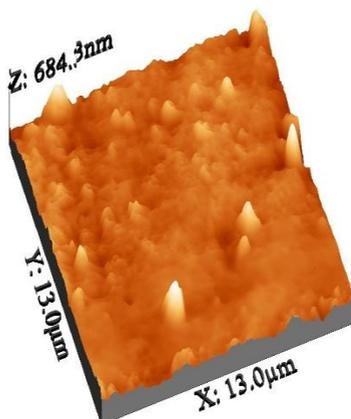
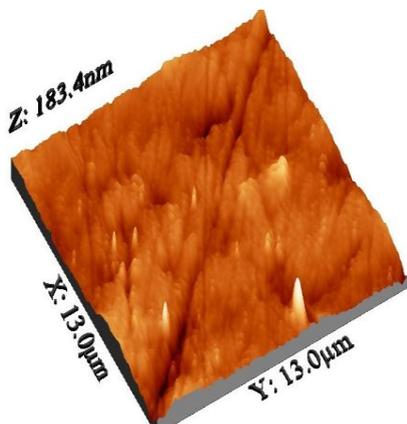
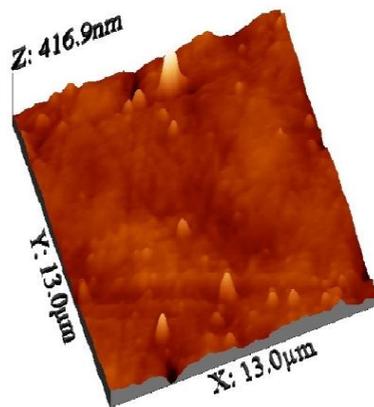


Figure 9. Shows AFM images the surface topography of Ti6Al4V discs (A) C1; (B) C2; (C) 5 μ A and (D) 10 μ A.

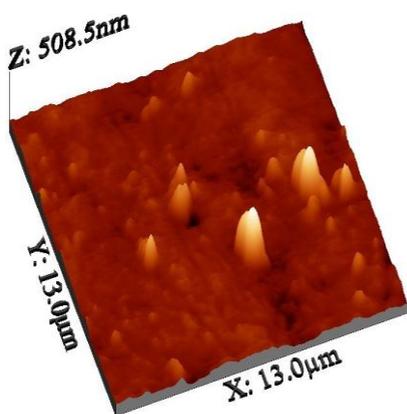
A



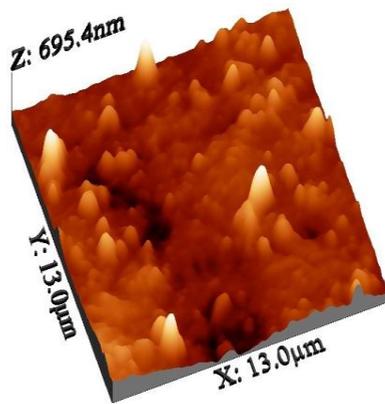
B



C



D

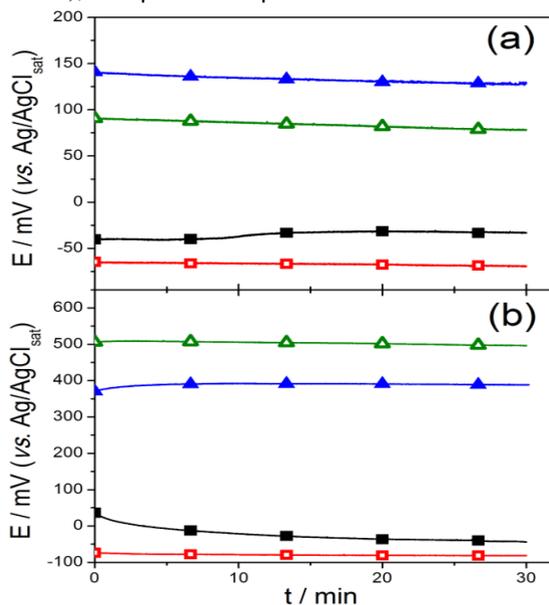


6.4.6 Electrochemical Tests

The evolution of OCP versus time in DMEM + FBS or PBS solutions (pH 7.4) (C1 subgroup) is shown in Fig. 10. It was observed that OCP values for subgroups tests (5 μA and 10 μA) are more positive when compared to controls (C1 and C2) for Ti-CP group (Fig. 10a). Curves profile of the Ti-CP tests subgroups were similar and stabilized after a few minutes, while C1 showed a slight rise in 10 min and then stabilized and C2 remained stable throughout all the period.

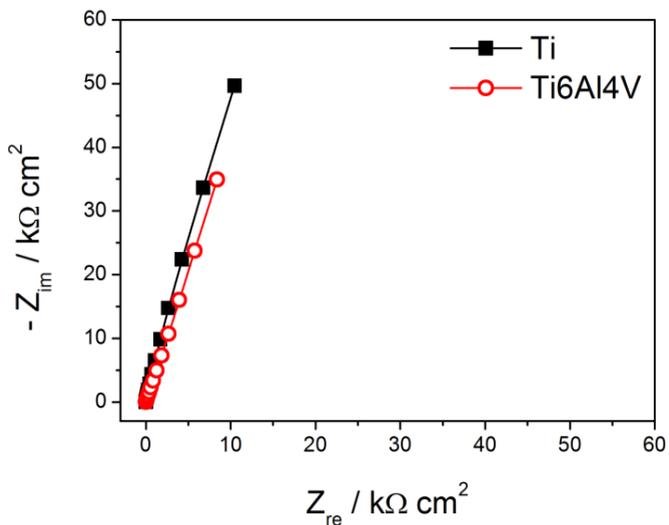
Regarding Ti6Al4V group (Fig. 10b), it was also observed that OCP values for subgroups tests (5 μA and 10 μA) are more positive when compared with controls (C1 and C2). In relation to curves profile, the subgroup 10 μA showed a slight drop in the first minute, stabilizing after 10 minutes. For the subgroup 5 μA the opposite occurred, a slight rise and stabilization after 10 minutes. Subgroup C1 began with positive values, stabilizing at negative values. And C2 expressed negative values (the most negative values among the samples) and stable throughout the period. The final values of OCP can be seen in Table 2.

Figure 10. Open Potential Circuit: (a) Ti-CP (b) Ti6Al4V para: ■ C1 (PBS), □ C2 (DMEM + FBS), ▲ 5 μA e ▲ 10 μA .



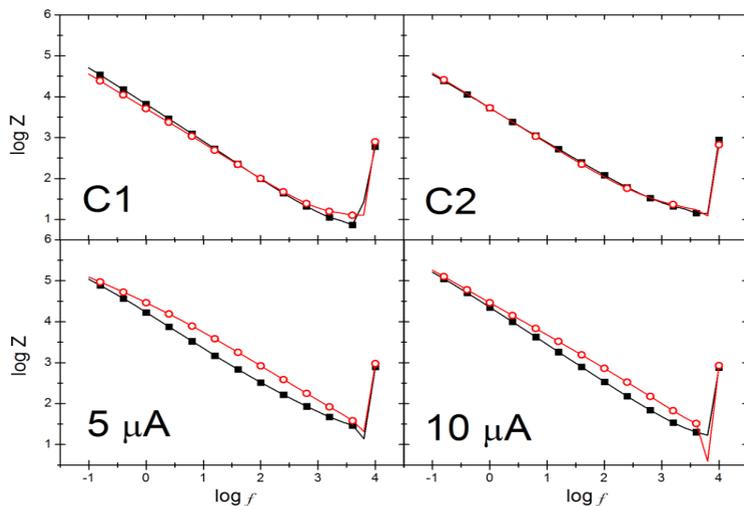
In Nyquist diagram (Fig.11), the C1 samples (control in PBS solution) exhibit a tendency to form a semicircle, however, is incomplete over a given range of frequencies considered.

Figure 11. Nyquist diagram: ■ Controle Ti-CP e ○ Controle Ti6Al4V



In Figure 12, it was observed that the impedance curve profile is similar for all samples, regardless of the material. However, the log Z values are different, but similar to the tests subgroups (5 uA and 10 uA) and controls subgroups (C1 and C2), as shown in Table 2.

Figure 12. Total Impedance vs. frequency: ■ Ti-CP e ○ Ti6Al4V



In Fig. 13, phase angle shows similarity between 5 μA and 10 μA , with two plateaus, identified by the arrows, while the control groups (C1 and C2), only a plateau, for Ti-CP and Ti6Al4V.

Figure 13. Phase angle vs. frequency ■ Ti-CP e ○ Ti6Al4V

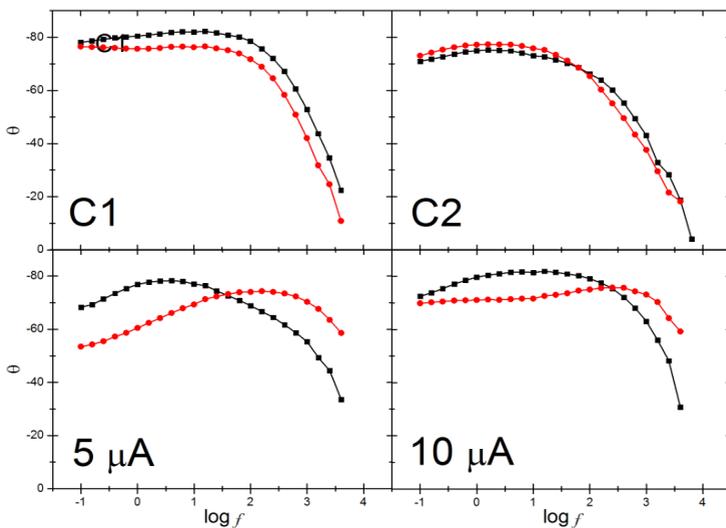


Table 2: Electrochemical Data

Ti_CP	OCP/mV	$R_p/k\Omega\text{cm}^2$	$C_{dl}/\mu\text{Fcm}^{-2}$	Ti6Al4V	OCP/mV	$R_p/k\Omega\text{cm}^2$	$C_{dl}/\mu\text{Fcm}^{-2}$
C1	-32,46	0,31	20,78	C1	-42,66	0,29	28,07
C2	-70,51	0,42	20,34	C2	-79,44	0,58	26,45
5 μA	137,3	0,45	9,21	5 μA	388,9	0,11	8,10
10 μA	74,43	1,03	6,20	10 μA	496,8	0,65	5,52

6.5. DISCUSSION

The data presented in this study showed that the application of direct and constant electric current modifies the titanium surface layer of titanium oxide on the surface also results in increased surface roughness. The protein adhesion derived from the FBS is affected during electric current application, probably due to titanium oxidation under constant electrical stimulation, because unstimulated surfaces, or the titanium oxide layer (film) passive found to be stable. Upon application of an electric current, the titanium surface showed significantly higher corrosion resistance values than the surface, which were not electrically stimulated.

The replacement of a tooth with dental implant has proven to be a viable and predictable treatment modality for treating partially or totally edentulous patients. Due to increased demand for implant-supported restorations, is increasing the need to install implants in areas with compromised bone quality and quantity (Shafer *et al.*, 1995). Various techniques have been developed to increase the amount of bone around the implant and enhance osseointegration. Among them: vertical and horizontal bone augmentation with autogenous bone grafts or bone substitutes (Al-Nawas and Schiegnitz, 2014), short implants (Esposito *et al.*, 2009), changes in the titanium implants design and surface (Esposito *et al.*, 2014). However, complications are common, as the morbidity of the donor site for autogenous grafts and resorption of bone grafts.

Preliminary and positive results (Fukada and Yasuda, 1957; Bassett *et al.*, 1974), regarding electrical current application in bone, drove the development of different methods for electrical stimulation, aiming to improve bone growth. So, many of the disadvantages of other techniques could be eliminated and electric induction would promote osseointegration around implants, allowing installation in low bone density areas. In direct current stimulation, the current applied can be continuous or pulsed (monophasic or biphasic). *In vitro* and *in vivo* (Brighton and Hunt, 1986; Friedenber *et al.*, 1989; Bodamyali *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2009) showed that the direct current speeds up bone formation process, probably stimulating the increase of pre-existing osteoblasts and mesenchymal cells that participate in the first stage of the process. These cells in greater numbers secrete more endothelial growth factor (VEGF), providing rapid invasion of blood

vessels. Consequently, there are more nutrients in the medium for mesenchymal cells to differentiate (Zipfel *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006).

One of the first and most important events before cellular activities starts - such as adhesion, proliferation, migration and differentiation - is plasma proteins adsorption in surfaces (Feng *et al.*, 2003). However, some studies (Feld and Grinnell, 1982; Yang *et al.*, 2003) suggest that cell adhesion is not dependent on the amount of protein adsorbed on the titanium surface.

In the present study, the amount of adsorbed proteins was determined based on the decrease in protein concentration of the solution after the liquid contact with the solid surface (Lowry *et al.*, 1951; Nakanishi *et al.*, 2001). Was showed a higher adsorption of proteins in the samples without electrical stimulation (C2) and lower in subgroups 10 μ A in both groups (Ti-CP and Ti6Al4V). Thus, the total protein adsorption on titanium surface decreases during the application of electrical current and the greater the intensity of the stimulus, low protein adsorption.

Williams and Williams (1988), *in vitro* model, found that albumin adsorption is relatively low on titanium oxide, probably due to the presence or absence of calcium on the surface. The BSA adsorption on titanium is dependent on protein concentration, pH level and the presence of calcium and phosphate ions (Diana *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 1999). Researchers (Sela *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2009) suggest that different surface properties such as roughness, thickness of oxide layer, surface energy and affect the amount of adsorbed proteins.

FTIR test identified the bands amide I (C=O) and amide II (NH) in the samples C2 and 5 μ A 10 μ A of both materials. Feng *et al.* (2003) demonstrated that BSA chemically adsorbed on the titanium surface by interaction of C and O groups and subsequently by groups: (OH)_b (OH)_e (H₂O)_d. Nitrogen is also an indicative signal of protein presence on titanium surface (Serro *et al.*, 1997; Serro *et al.*, 2000).

The adsorption of proteins on titanium implants surface can affect biological mechanism of surrounding tissues and therefore the implant success (Sela *et al.*, 2007).

SEM images and EDS analysis did not show topographical changes or presence of protein adsorbed on titanium surface. Electrical stimulation in physiological simulated medium increased R_a when observed by profilometry. In Ti6Al4V discs, this profile was confirmed by AFM. However, Ti-CP group, test samples (5 μA and 10 μA) had lower values for the roughness parameters that control (C2), immersed in DMEM + FBS. The small number of samples and the different topography can explain this difference after grinding and polishing, since the accuracy is higher in the AFM.

Another explanation for the data found for Ti-CP is based on the statements of Deligianni *et al.* (2001). These authors showed that cell attachment and proliferation are surface roughness sensitive, as well as protein adsorption. And that human serum albumin is preferentially adsorbed on the smooth surface of titanium, while fibronectin and total protein bind more to rough surfaces.

Moreover, researchers have suggested that micro and nano texturing of titanium surface promotes cell adhesion (Jayaraman *et al.*, 2004); influences the morphology and cell density and regulates early expression of bone proteins (de Oliveira and Nanci, 2004). However, Kyul Kim *et al.* (2013) argue that surface roughness may not be what most influences cells response. In addition, roughness affects the dynamic wettability behavior and contact angle of modified titanium surfaces (Lim *et al.*, 2001; Rupp *et al.*, 2004).

Regarding corrosion, the development of OCP showed more positive values for subgroups tests (5 μA and 10 μA), followed by the control subgroup (C1) immersed in PBS solution for both titanium alloys, however, with different potential ranges. Indeed, surfaces passed through the electrically stimulated oxidation process, which altered the titanium oxide layer resulting on modified titanium oxides film with corrosion resistance. The control subgroups surfaces showed a greater tendency to oxidation reactions than test groups.

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is considered an important technique for the investigation of electrochemical behavior of passive films. In this technique, the polarization resistance (R_p) - an important parameter in the calculation of the corrosion rate - can be obtained through the system impedance measuring electrode/electrolyte over a wide frequency band (Mascaro and Marino, 2004). These data

were compared to evaluate the influence of physiological simulated medium, which contains proteins, and electric current application on the stability of passive oxide on different materials.

For Bode diagram (phase angle and. Frequency), was held to scan frequencies starting with the solution analysis. On every curve there was only a phase constant element (PCE), indicating the Randle electrical circuit. The values of R_p were obtained by applying the simulation for this circuit.

The Randle circuit suggests that the titanium oxide passive film is present on the surface of the simulated physiological solutions. As the EIS test was performed after application of electrical current, was not detected the presence of pores. However, it is believed that during the application of electric current could be detected pores due to passive film breakdown.

This result is in agreement with Bode diagram (frequency vs. impedance) and the capacitance values, since subgroups 5 μA and 10 μA showed the highest R_p values and lowest C_{dl} values, both for CP-Ti and Ti6Al4V. This is probably due to the titanium oxide film formed in medium with proteins to a greater thickness and dielectric properties resulting in increased resistance to electrical charge transfer and thus improved corrosion resistance of the material. Results in agreement with the literature (Souza *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2015)

Corroborating this study, researchers reported that the addition of BSA significantly move OCP values to a negative potential (Cheng and Roscoe, 2005). According Contu *et al.* (2002), such addition influences the corrosion of the titanium, increasing the polarization resistance (R_p), probably due to the ability of proteins to bind the free oxygen ions at the metal/oxide interface.

Improved corrosion resistance is important to increase biocompatibility. Body fluids are considered corrosive to metals. The release of metal ions and/or toxic particles through corrosion or wear processes may induce the inflammatory cascade; therefore reduce the biocompatibility and cause tissue damage. Vanadium and aluminum ions, released from Ti6Al4V surface, are associated with serious health problems, adverse reactions of tissues and neurological disorders (Jeong *et al.*, 2001). Therefore, it is important to change the surface of the

titanium effectively, preventing the release of harmful ions and contributing to a better biological response.

6.6. CONCLUSION

Considering the limitations of this in vitro study on the influence of electrical stimulation on the titanium surface, conclusions can be described as follows:

- Morphological alterations were found - higher roughness – on titanium surface after electrical stimulation;
- An inversely proportional relationship between applied electric current and protein adsorption-based layer has been found: the greater the electrical current intensity lower protein adsorption;
- Was observed a greater tendency to oxidation reactions and corrosion resistance on the electrically stimulated titanium surfaces;
- The findings suggest that studies can be performed by varying the electric current and its method of application, as well as the immersion medium (simulation).

6.7. REFERENCES

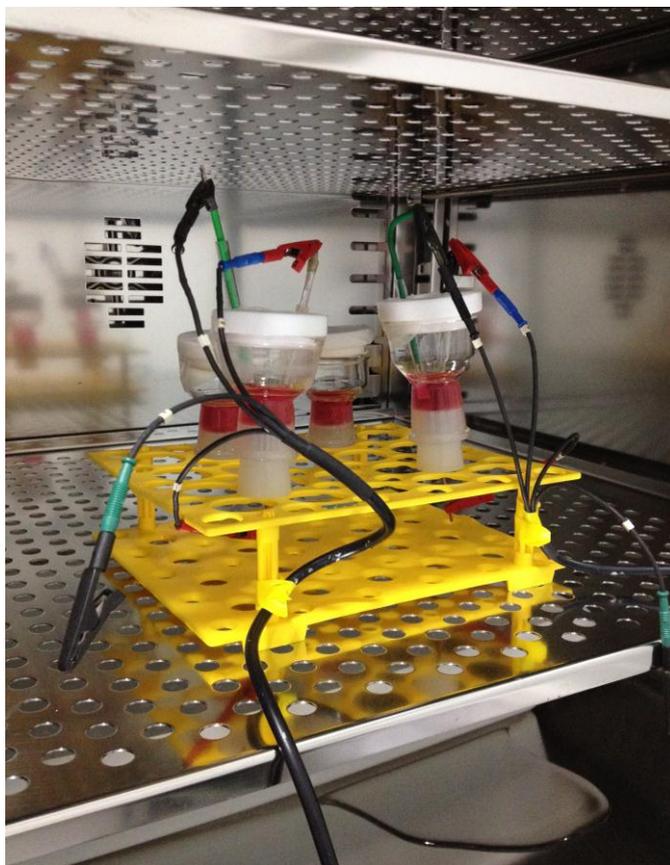
See page 65-74.

7 METODOLOGIA EXPANDIDA

7.1 DESENVOLVIMENTO DA CÉLULA ELETROLÍTICA

Na impossibilidade de utilizar as células eletrolíticas disponíveis no mercado, projetou-se e confeccionou-se um dispositivo bioinerte e auto-clavável; em vidro, silicone grau médico e tampa de teflon, que mantivesse a solução inalterada e permitisse a inserção dos eletrodos necessários para aplicação de corrente elétrica, como mostra a Fig. 1.

Figura 9. Células eletrolítica preparada para ensaio Valganostático.



7.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostras cilíndricas de titânio comercialmente puro grau IV e liga Ti6Al4V (BiorAcnis, Brasil) foram utilizadas como substrato. As dimensões das amostras, cortadas a partir de barras, de 8 mm de diâmetro X 15 mm de altura. O tratamento das amostras consistiu de polimento com lixas d'água de granulometrias decrescentes de 200 até 2500, posteriormente polidas com feltro e alumina (1,0 μm ; 0,5 μm e 0,3 μm). Após o polimento, realizou-se banho de ultrassom com álcool 70% e com água destilada durante 10 minutos. Em seguida, levaram-se as amostras à auto-clave para serem esterilizadas durante 20 min e armazenadas em estufa a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Preparou-se as amostras no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT) do Departamento de Engenharia Mecânica e no Laboratório de Pós-Graduação do Departamento de Odontologia, da Universidade Federal de Santa Catarina

7.3 APLICAÇÃO DA DENSIDADE DE CORRENTE ELÉTRICA (Ensaio Valganostático)

Os ensaios com aplicação de corrente elétrica foram realizados por meio do ensaio Valganostático. Utilizou-se uma célula eletroquímica com capacidade para 5 mL de solução, que comporta três eletrodos. O eletrodo de trabalho (ET) consistiu das amostras citadas acima, nas quais se fez um contato elétrico com fio de cobre. O eletrodo de referência (ER) foi de prata/cloreto de prata em solução de KCl saturado ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$), e o contra eletrodo (CE) foi uma placa de platina. Os ensaios de CP foram realizados em um potenciostato PalmSens (Palm Instruments BV, Holanda) acoplado a um microcomputador que rodava o *software* PStTrace 4.4 para aquisição e análise dos dados. Utilizou-se um volume de 5000 μL de solução de trabalho. Esta solução é composta por Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco, Invitrogen) + 10% Soro Fetal Bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) (Gibco, Invitrogen) + Antibióticos (1% penicilina/estreptomicina) (Sigma-Aldrich), pH 7,4. FBS é um suplemento complexo, rico em proteínas, especialmente Albumina (23,1 mg/ml). A albumina é o componente mais abundante de muitos fluidos biológicos, que serve como meio de transporte para vários metabolitos e como regulador de pressão osmótica (Wassell e Embery, 1996). As células eletroquímicas foram esterilizadas em estufa com luz ultra violeta durante 30 min, assim como os

eletrodos. Após a esterilização, todo o aparato foi transferido para uma estufa, a 36 °C com controle de umidade e de concentração de CO₂.

As amostras foram divididas em dois grupos, dependendo do biomaterial utilizado: Ti CP e Ti6Al4V, para realização dos ensaios de CP. A divisão em subgrupos baseou-se na quantidade de corrente que seria aplicada ao ET. Aplicou-se diferentes densidades de corrente elétrica durante 3 horas (Yang et al., 2003) em cada subgrupo: (A) 0 µA – na ausência de meio, (B) 0 µA – na presença de meio, (C) 5 µA e (D) 10 µA. O potencial resultante, fruto da diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e de referência, foi monitorado a cada 30 segundos durante os testes, e o gráfico resultante de E vs. t foi adquirido, porém os dados obtidos não tiveram utilidade direta para o trabalho.

Ti-CP: C1 (Controle 1 – 0 µA – ausência de DMEM + FBS)
C2 (Controle 2 – 0 µA – presença de DMEM + FBS)
5 µA (Aplicação de 5 µA em meio DMEM + FBS)
10 µA (Aplicação de 10 µA em meio DMEM + FBS)

Ti6Al4V: C1 (Controle 1 – 0 µA – ausência de DMEM + FBS)
C2 (Controle 2 – 0 µA – presença de DMEM + FBS)
5 µA (Aplicação de 5 µA em meio DMEM + FBS)
10 µA (Aplicação de 10 µA em meio DMEM + FBS)

7.4 ANÁLISE DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

7.4.1 Determinação das proteínas totais por teste colorimétrico – Método de Lowry

A quantificação de proteínas nas amostras foi realizada pelo Método de Lowry modificado, que consiste em duas reações colorimétricas: 1) a reação de Biureto, na qual os íons Cu²⁺ interagem com as ligações peptídicas originando uma coloração azul intensa; 2) a reação que envolve a adição do reagente de Folin-Ciocalteau (Sigma - Aldrich) em uma mistura complexa de sais inorgânicos, cuja reação com a tirosina e o triptofano resulta em uma coloração azul esverdeada intensa. A combinação dessas duas reações fornece um teste muito mais sensível que as duas reações isoladamente (Lowry et al., 1951). Nesta etapa, foram combinados 20 µL do sobrenadante obtido no final da reação, 60 µL de água MilliQ e 200 µL do Reagente A (Na₂CO₃ 2%,

NaOH 0,1 M. CuSO₄ 1%, Tartarato 2%). Após o tempo de reação de 10 minutos, a temperatura ambiente, adicionou-se 20 µL do Reagente B (Folin) e aguardou-se 20 minutos, a temperatura ambiente, para análise em espectrofotômetro UV-VIS (Molecular Devices, Spectra Max Plus 384, EUA) no comprimento de onda de 750nm. O padrão mais indicado para este tipo de determinação é a albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*)), no intervalo de 5-80 mg de proteína/mL e os dados foram expressos como µg de proteína/mL (curva padrão em APENDICE X).

A quantificação de proteínas totais foi realizado no Laboratório de Tecnologias Integradas (Intelab), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina.

7.4.2 Análise quantitativa, em tempo real, FT-IR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)

Realizou-se a lavagem dos discos de titânio com solução tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) e a fixação em glutaraldeído 2,5% por 1 hora. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico (30 - 100%) por 15 min cada. Após a secagem, em estufa a 30 °C durante 12 horas, obteve-se o espectro de absorção de Infravermelho utilizando FT-IR em modo de refletância total atenuada (ATR, em inglês *attenuated total reflectance*) equipado com um único cristal de ZnSe (Bruker, Tensor 27). Analisaram-se as amostras pelo modo de transmitância na região entre 4000-600 cm⁻¹, por acúmulo de 32 varreduras, com resolução de 4 cm⁻¹, no Laboratório de Materiais (LABMAT) do Departamento de Engenharia Mecânica, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Conforme literatura [Yu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2014], o espectro de BSA exibe duas bandas de absorção vibracional em cerca de 1.700 a 1.600 cm⁻¹ e 1.550 a 1.500 cm⁻¹ que pode ser atribuído a C=O modo de alongamento da amida I e a N-H modo de flexão da amida II, respectivamente.

7.5 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

7.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para obtenção das imagens de microscopia eletrônica e varredura (MEV), as amostras foram processadas conforme descrito no item 5.4.2. A secagem foi realizada em estufa a 30 °C durante 12 horas. As amostras foram recobertas com uma camada de Ouro-Paládio e coladas com fita de carbono dupla face em um suporte. Para análise, utilizou-se o microscópio eletrônico (JEOL JSM-6390LV), com fonte de elétrons de tungstênio, detector de elétrons secundários e nas tensões entre 10 e 15 kV, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Universidade Federal de Santa Catarina, com o intuito de visualizar a topografia dos discos, nas diferentes aplicações de densidade de corrente elétrica. Obtiveram-se cinco áreas em diferentes ampliações (x100, x500, x1000, x2000, x3000) em uma amostra de cada grupo. As amostras fixadas também foram analisadas por meio de Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS, do inglês *energy dispersive X-ray spectroscopy*), com finalidade de observar sua composição química.

7.5.2 Perfilometria

Realizou-se a lavagem dos discos de titânio com água destilada estéril e a extração das proteínas com Tween 20 a 1% com água destilada, aquecido por 30 min a 100 °C (Liljas, *et al.*, 1974). A secagem foi realizada em estufa a 30 °C durante 12 horas. Posteriormente, mediu-se a rugosidade superficial de duas amostras de cada grupo, por meio de um perfilômetro óptico (Bruker, DektakXT, EUA). Obtiveram-se cinco áreas de 200 µm, em cada disco, percorrida por agulha de diamante de 2 µm, resultando nas medidas de rugosidade média (R_a) e rugosidade máxima total (R_t) – diferença entre o pico mais alto e o vale mais profundo no comprimento de avaliação da amostra, independentemente dos valores de rugosidade parcial.

7.5.3 Microscopia de Força Atômica

Analisaram-se as amostras com extração de proteína, após protocolo e secagem (conforme descrito anteriormente em 5.5.2), utilizando a técnica de microscopia de força atômica (AFM, do inglês *atomic force microscopy*) em um microscópio Nanosurf FlexAFM

(easyScan 2 Controller, Suíça), operando em modo "*Tapping*" - contato intermitente, ponta modelo NCLR (raio < 10 nm), frequência de ressonância 190 kHz, constante de mola 48 N m^{-1} e velocidade de varredura linha s^{-1} . As imagens foram processadas e os valores de rugosidade média (R_a) e raiz do valor quadrático médio (RMS, do inglês *root mean square*) foram calculados com o software AFM WSxM4.0. (Nanotec Electronica, Espanha). As imagens do AFM e as análises da rugosidade foram obtidas a partir da área de $13 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$ sobre a superfície da amostra. As amostras foram analisadas no Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos (LOOSA), do Departamento de Física, da Universidade Federal de Santa Catarina.

7.5.4 Potencial de Circuito Aberto e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Realizaram-se caracterizações eletroquímicas das superfícies das amostras submetidas aos ensaios com aplicação de corrente elétrica e os grupos controles. Os testes foram realizados após ensaios de CP. Nas caracterizações eletroquímicas, mediu-se o potencial de circuito aberto (OCP, do inglês *open circuit potential*) durante 30 min, seguido por teste de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*). Os ensaios de EIS foram realizados em circuito aberto (sem aplicação de potencial) com uma varredura de frequências na faixa de 10^5 Hz a 10^{-2} Hz, com uma onda sinusoidal de 10 mV de amplitude e frequência de varredura de 5 frequências/década. Estes testes foram realizados em um potenciostato Voltalab PGZ100 (Radiometer Copenhagen, Dinamarca) acoplado a um computador utilizando o *software* Voltmaster 4.0, para análise e tratamento dos dados. Utilizou-se as mesmas células eletroquímicas com o mesmo arranjo de eletrodos citados na seção 4.1.2, em temperatura ambiente. Para cada amostra, esta sequência foi completada 3 vezes. Os testes foram realizados no Laboratório do Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (GEPEEA), do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os ensaios de EIS foram úteis para obter informações sobre o comportamento de degradação do material, sobre a quantidade de fases formadas na superfície das amostras após os ensaios de aplicação de corrente e para estimar o valor da resistência à corrosão do material em solução DMEM + BSA.

7.5.5. Análise estatística

Realizaram-se a análise de variância (One-Way ANOVA) e o teste de Tukey para as comparações múltiplas (STATISTICA, Statsoft Inc, USA). Adotou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

8 REFERÊNCIAS

- Aaron, R.; Ciombor, D.; Wang, S.; Simon, B. Clinical biophysics: the promotion of skeletal repair by physical forces. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1068:513-31.
- Andrade JD, Hlady V. Protein adsorption and materials biocompatibility-a tutorial review and suggested hypotheses. *Advances in Polymer Science* 1986; 79: 1-63.
- Aro H, Eerola E, Aho AJ, Penttinen R. Electrostimulation of rat callus cells and human lymphocytes in vitro. *J Orthop Res.* 1984;2(1):23-31.
- Barquero Cordero, Ernesto. Avaliação da formação óssea em implantes usinados de titânio estimulados eletricamente: estudo em Cães. 2012. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração Implantodontia) – Programa de Pós- Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia,
- Barquero Cordero, Ernesto. Avaliação do torque de remoção na interface osso-implante promovido por estímulo elétrico em implantes dentários: estudo em cães. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Bassett CA, Pawluk RJ, Pilla AA. Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields. A surgically noninvasive method. *Ann N Y Acad Sci.* 1974; 238: 242-262.
- Bilal Al-Nawas, Eik Schiegnitz. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone – a systematic review and meta-analysis. *Eur J Oral Implantol* 2014;7(Suppl2):S219–S234.
- Bodamyali T, Kanczler JM, Simon B, Blake DR, Stevens CR. Effect of faradic products on direct current- stimulated calvarial organ culture calcium levels. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:657–661.
- Brighton CT, Hunt RM (1986). Ultrastructure of electrically induced osteogenesis in the rabbit medullary canal. *J Orthop Res* 4:27-36.

Broggini et al., Persistent acute inflammation at the implant–abutment interface, *J. Dent. Res.* 82 (2003) 232.

Buch, F.; Albrektsson, T.; Herbs, T. Direct current influence on bone formation in titanium implants. Abstract. *Biomaterials*. 1984 Nov;5(6):341-6.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini J, Fox C, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed Mater Res*. 1991;25:889-902.

C. Manaranche, H. Hornberger, A proposal for the classification of dental alloys according to their resistance to corrosion, *Dent. Mater.* 23 (2007) 1428–1437.

C.E.B.Marino, L.E.Mascaro, EIS characterization of a Ti-dental implant in artificial saliva media: dissolution process of the oxide barrier, *J. Electroanal. Chem.* 568 (2004) 115–120).

C.J. Pan, Y.H. Hou, B.B. Zhang and L.C. Zhang. Fabrication of anticoagulation layer on titanium surface by sequential immobilization of poly (ethylene glycol) and albumin. *Bio-Medical Materials and Engineering* 24 (2014) 781–787

Cheng, Xiaoliang and Roscoe, Sharon. Corrosion behavior of titanium in the presence of calcium phosphate and serum proteins. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, pp. 7350-7356.

Contu F, Elsener B, Hohni H. Characterization of implant materials in fetal bovine serum and sodium sulfate by electrochemical impedance spectroscopy. I. Mechanically polished samples. *J Biomed Mater Res* 2002;62:412–21.

Cruz, Souza, Henriques et al. Tribocorrosion and Bio-Tribocorrosion in the Oral Environment: The Case of Dental Implants. In: *Biomedical Tribology*. Nova Science Publishers 2011. 01-33.

de Oliveira, P.T. & Nanci, A. (2004) Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 25: 403–413.

Davies, J.E. (2005) Understanding Peri-Implant Endosseous Healing. Re-issued from: *Journal of Dental Education* 67, Number 8, August 2003.

Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 2001; 22: 1241-1251.

Diana T, Wassell H, Embery G. Adsorption of bovine serum albumin on to titanium powder. *Biomaterials* 1996;17:859–64.

Elias, C.N., *et al.* Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J. Of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials I.* 2008; 234–242.

Eriksson, C., Nygren, H. & Ohlson, K. (2004) Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. *Biomaterials* 25: 4759–4766.

Esposito M, Ardebili Y, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 7.

Feng, J Weng, B.C Yang, J.Y Chen, J.Z Zhao, L He, S.K Qi, X.D Zhang. Surface characterization of titanium and adsorption of bovine serum albumin. *Materials Characterization*, Volume 49, Issue 2, September 2002, 129–137

Friedenberg, Z. B.; Brighton, C. T.; Michelson, J. D.; Bednar, J.; Schmidt, R.; Brockmeyer, T. The effects of demineralized bone matrix and direct current on an "in vivo" culture of bone marrow cells. *J Orthop Res.* 1989;(7):22-7.

Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J PhysSoc Japan.* 1957; 12: 1158-69.

Griffin M, Bayat A. Electrical stimulation in bone healing: critical analysis by evaluating levels of evidence. *Eplasty.* 2011; 11: e34.

Grinnell F, Feld MK. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biological Chem* 1982;257:4888–4893.

Healy KE, Ducheyne P. Hydration and preferential molecular adsorption on titanium in vitro. *Biomaterials* 1992;13:553–61.

J.Hey,F.Beuer,T.Bensel,A.Boeckler,Single crowns with CAD/CAM fabricated copings from titanium: 6-years clinical results, *J. Prosthet. Dent* 112 (2) (2014) 150–154.

Jayaraman, M., Meyer, U., Buhner, M., Joos, U. & Wiesmann, H.P. (2004) Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 25: 625–631.

Jeong YH, Choe HC, Brantley WA. Corrosion characteristics of anodized Ti-(10-40 wt%) Hf alloys for metallic bio- materials use. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:41-50.

Jimbo R, Ivarsson M, Koskela A, Sul YT, Johansson CB. Protein Adsorption to Surface Chemistry and Crystal Structure. Modification of Titanium Surface *J Oral Maxillofac Res* 2010 (Jul-Sep);1(3)

K. Bordji, J.Y. Jozeau, D. Mainard, E. Payar, P. Nether, T. Stucky, M. Hage Ali, *Biomaterials* 17 (1996) 929.

Kazuhiro Nakanishi, Takaharu Sakiyama, Andkoreyoshi Imamura. On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 91, No. 3, 233-244. 2001

Kim IS, Song JK, Zhang YL, Lee TH, Cho TH, Song YM. Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblast. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1763:907 – 916.

Korenstein, R.; Somjen, D.; Fischler, H.; Binderman, I. Capacitative pulsedelectric stimulation of bone cells: induction of cyclic-AMP changes and DNA synthesis, *biochim. Biophys. Acta* 803. 1984:302-7.

Kyul Kim, Bo-Ah Lee, Xing-Hui Piao, Hyun-Ju Chung, Young-Joon

Kim. (2013) Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface. *J Periodontal Implant Sci* 43:198-205.

Lars Liljas, Per Lundahl, Stellan Hjertien. Selective solubilization with tween 20 of proteins from water-extracted human erythrocyte membranes analysis by gel electrophoresis in dodecylsulfate and in tween 20. *Biochimica et biophysica acta*, 352 (1974) 327-337

Lim, Y.J., Oshida, Y., Andres, C.J. & Barco, M.T. (2001) Surface characterizations of variously treated titanium materials. *Oral & Maxillofacial Implants* 16: 333–342.

Lossdorfer, S., Schwartz, Z., Wang, L., Lohmann, C.H., Turner, J.D., Wieland, M., Cochran, D.L. & Boyan, B.D. (2004) Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal of Biomedical Materials Research A* 70: 361–369.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265-275

M.G. Manda, P.P. Psyllaki, D.N. Tsipas, P.T. Koidis, Clinical device-related article observations on an in-vivo failure of a titanium dental implant/abutment screw system: a case report, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 89B (2009) 264–273.

M.Niinomi, Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 4 (2003) 445–454.

MacDonald DE, Deo N, Markovic B, Stranick M, Somasundaran P. Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 2002; 23: 1269-1279.

MacDonald, D.E., Rapuano, B.E., Deo, N., Stranick, M., Somasundaran, P. & Boskey, A.L. (2004) Thermal and chemical modification of titanium–aluminum–vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment. *Biomaterials* 25: 3135–3146.

Marco Esposito, Maria Gabriella Grusovin, Pietro Felice, Georgios Karatzopoulos, Helen V Worthington, Paul Coulthard .The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants— a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol* 2009;2(3)167–184.

Oliva, Fabiana Y., Cámara, Osvaldo R. and Avalle, Lucía B. Adsorption of human serum albumin on electrochemical titanium dioxide electrodes: Proteins-oxide surface interaction effects studied by electrochemical techniques. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2009, Vol. 633, pp. 19-34.

Ponsonnet *et al.*, 2003; 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 & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* 2003; 23: 551-560.

Puleo, D. A.; Nanci, A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*. 1999, 20: 2311–2321.

Rupp, F., Scheideler, L., Rehbein, D., Axmann, D. & Geis-Gerstorfer, J. (2004) Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials* 25: 1429–1438.

Sang-Woon Lee, Byung-Dong Hahn, Tae Yeon Kang, Myung-Jin Lee, Je-Yong Choi, Min-Keun Kim, and Seong-Gon Kim. Hydroxyapatite and collagen combination-coated dental implants display better bone formation in the peri-implant area than the same combination plus bone morphogenetic protein-2–coated implants, hydroxyapatite only coated implants, and uncoated implants. *J Oral Maxillo- fac Surg* 2014. 53-60.

Sela MN, Badihi L, Rosen G, Steinberg D, Kohavi D. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces.*Clin. Oral Impl. Res.* 18, 2007; 630–638

Serro AP, Fernandes AC, Saramago B, Lina J, Barbosa MA. Apatite deposition on titanium surfaces - the role of albumin adsorption. *Biomaterials* 1997;18:963 – 8.

Serro AP, Fernandes AC, Saramago B. Calcium phosphate deposition

on titanium in the presence of fibronectin. *J Biomed Mater Res* 2000;49:345 – 52.

Shafer, D. M.; Rogerson, K.; Norton, L.; Benneth, J. The effect of electrical perturbation on osseointegration of titanium dental implants: a preliminary study. *J Oral Maxillofacial Surgery*. 1995;53:1063-8.

Shayesteh, Y. S.; Eslami, B.; Dehghan, M. M.; Vaziri, H.; Alikhassi, M.; Mangoli, A. et al. The effect of a constant electrical field on osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: a preliminary study. *Journal of Prosthodontics*. 2007 Sep- Oct;16(5):337-42.

Shigino, T.; Ochi, M.; Hirose, Y.; Hirayama, H.; Sakaguchi, K. Enhancing osseointegration by capacitively coupled electric field: a pilot study on early occlusal loading in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16:841-50.

Shigino, T.; Ochio, M.; Sakaguchi, H.; Sakaguchi, K.; Nakade, O. Application of capacitively coupled electric field enhances periimplant osteogenesis in the dog mandible. *Int J Prosthodontic*. 2000;13:365-72.

Song, J.; Tae H. Cho; Hui Pan; Yoon M. Song; In S. Kim; Tae H. Lee; Soon J. Hwang; Sung J. Kim. An Electronic Device for Accelerating Bone Formation in Tissues Surrounding a Dental Implant. *Bioelectromagnetics* 2009; 30: 374 – 384.

Souza, J.C.M.; Barbosa, S.L.; Ariza, E.; Celis, J.-P; Rocha, L.A. Simultaneous degradation by corrosion and wear of titanium in artificial saliva containing fluorides, *Wear* 292 (2012) 82–88.

Souza, J.C.M.; Barbosa, S.L.; Ariza, E.; Henriques, M., Teughels, W.; Ponthiaux, P.; Celis, J.-P; Rocha, L.A. How do titanium and Ti6Al4V corrode in fluoridated medium as found in the oral cavity? An in vitro study. *Materials Science and Engineering C* 47 (2015) 384–393.

Thomas F. Keller, Jörg Reichert, Tam Pham Thanh, Ranko Adjiski, Lothar Spiess, Liga Berzina-Cimdina, Klaus D. Jandt, Jörg Bossert. Facets of protein assembly on nanostructured titanium oxide surfaces. *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 5810–5820.

Thomas KA, Cook S. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J. Biomed Mater Res.* 1985;19:875-901.

Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontics applications: a review of the literature. *Quintessence Int* 1996;27:401-8.

Wilke HJ, Claes L, Steinemann S. The influence of various titanium surfaces on the interface shear strength between implants and bone. 1990. In: Heimke, G., Soltesz, U. & Lee, A.J.C., eds. *Clinical Implant Materials (Advances in Biomaterials No. 9)*, 309–314. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV. In: Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann S. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J. Dental Res.* 2004;83:529-533.

Williams, R.L. and D.F.Williams.1988."The Characteristics of Albumin Adsorption on Metal Surfaces," *Biomaterials*, pp. 206-212.

X. N. Hu, B. C. Yang. Conformation change of bovine serum albumin induced by bioactive titanium metals and its effects on cell behaviors. *J Biomed Mater Res Part A: 102A: 1053–1062*, 2014.

Xiaohua Yu, Haibo Qu, David A. Knecht, Mei Wei. Incorporation of bovine serum albumin into biomimetic coatings on titanium with high loading efficacy and its release behavior. *J Mater Sci: Mater Med (2009) 20:287–294*.

Yang YZ, Cavin R, Ong JL. Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003; 67A: 344- 349.

Zeng H, Chittur KK, Lacefield WR. Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials* 1999;20:377–84.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74A:49–58

Zipfel GJ, Guiot BH, Fessler RG. 2003. Bone grafting. *Neuro- surgical*

Focus 14:1–8.

9 APÊNDICE

8.1 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS – CURVA PADRÃO

