

ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE ÓXIDO DE TITÂNIO EM DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSO DE SILANIZAÇÃO PARA IMOBILIZAÇÃO DE PEPTÍDEO

André Aguiar Marques, Instituto Militar de Engenharia, andre.marques@ime.eb.br, ORCID: 0000-0003-1511-4038

Carlos Nelson Elias, Instituto Militar de Engenharia, elias@ime.eb.br, ORCID: 0000-0002-7560-6926

Marcelo Henrique Prado da Silva, Instituto Militar de Engenharia, marceloprado@ime.eb.br, ORCID: 0000-0002-1182-5345

Álvaro José Boareto Mendes, Instituto Militar de Engenharia, boareto@ime.eb.br, ORCID: 0000-0003-1432-9045

Bruno Martins de Souza, Instituto Militar de Engenharia, bruno.souza@ime.eb.br, ORCID: 0000-0002-1075-0441

Roberto Hirsch Monteiro, Instituto Militar de Engenharia, robertohmonteiro@ime.eb.br, ORCID: 0000-0003-4506-5820

RESUMO

Uma das estratégias para aprimorar a osseointegração é a modificação da topografia da superfície do implante de titânio. No entanto, as principais modalidades de modificação física, química e topográfica já são amplamente estudadas e documentadas. O início de uma nova era na evolução dos materiais bioativos traz a possibilidade de inovações como a imobilização de peptídeos com propriedades antimicrobianas ou até mesmo de ligação à hidroxiapatita (HBPs) na superfície do titânio com o objetivo principal de aprimorar a deposição mineral, bioatividade e consequente a osseointegração desses implantes. A associação de peptídeos às superfícies de titânio pode ser realizada através do método de silanização que viabiliza uma ligação covalente entre o peptídeo e o silano ancorado na superfície de titânio previamente ativada. Este estudo propõe a análise através de microscopia eletrônica de varredura e caracterização em interferometria a laser de superfícies de titânio em três etapas diferentes do processo de silanização que precedem a associação de peptídeo. Foram utilizados discos de titânio Grau 4 com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura submetidos a condicionamento ácido, condicionamento alcalino e incorporação do silano. As superfícies de óxido de titânio dos discos nessas três etapas do processo de preparação foram analisadas e caracterizadas, comparando o padrão de uniformidade, parâmetros de rugosidade e molhabilidade encontrados. Os resultados mostraram todas as etapas do tratamento mantiveram uma superfície microrrugosa uniforme com parâmetros de rugosidade adequados e compatíveis com os parâmetros considerados ideais, no entanto, houve uma variação importante quanto a molhabilidade nos grupos estudados.

Palavras-chave: titânio, peptídeo, silanização, rugosidade, molhabilidade.

ABSTRACT

One of the strategies to improve osseointegration is modifying the surface topography of the titanium implant. However, the main modalities of physical, chemical and topographic modification are already widely studied and documented. The beginning of a new era in the evolution of bioactive materials brings the possibility of innovations such as the immobilization of peptides with antimicrobial properties or even binding to hydroxyapatite

(HBPs) on the surface of titanium with the main objective of improving mineral deposition, bioactivity and consequent osseointegration of these implants. The association of peptides to titanium surfaces can be performed through the silanization method, which enables a covalent bond between the peptide and the silane anchored on the previously activated titanium surface. This study proposes the analysis through scanning electron microscopy and characterization in laser interferometry of titanium surfaces in three different stages of the silanization process that precede the peptide association. Grade 4 titanium discs with 6 mm in diameter and 2 mm thick were used, subjected to acid etching, alkaline etching and silane incorporation. The titanium oxide surfaces of the discs in these three stages of the preparation process were analyzed and characterized, comparing the uniformity pattern, roughness and wettability parameters found. The results showed that all stages of the treatment maintained a uniform micro-rough surface with adequate roughness parameters and compatible with the parameters considered ideal, however, there was an important variation in terms of wettability in the studied groups.

Keywords: titanium, peptide, silanization, roughness, wettability.

INTRODUÇÃO

Apesar da taxa de sucesso dos implantes osseointegráveis ser da ordem de 95-98%, novas técnicas de modificação de superfície dos implantes são continuamente desenvolvidas para melhorar a rugosidade, molhabilidade, adesão, fixação de célula, proliferação celular e a osseointegração¹. Procura-se com os tratamentos obter a rugosidade adequada dos implantes para mimetizar a estrutura óssea do hospedeiro e melhorar a biocompatibilidade dos implantes².

Paralelamente, as alterações na camada de óxidos metálicos, como o titânio, as técnicas de funcionalização de superfícies com materiais bioativos têm sido investigadas e desenvolvidas³.

A funcionalização das superfícies de óxidos metálicos é bastante relevante na área de biomateriais uma vez que esta é capaz de controlar a molhabilidade do material⁴, a energia de superfície⁵, a adsorção de proteínas⁶, a liberação de drogas⁷ e a interação das células com o implante⁸.

A funcionalização da superfície com silanos é um dos métodos mais comumente usados para preparar monocamadas em óxidos. A principal vantagem do uso de silanos em superfícies de óxidos metálicos é a rápida formação de uma ligação covalente entre o substrato e o grupo de ancoragem. Esta ligação covalente estabiliza a monocamada e permite modificações químicas posteriores, como a associação de peptídeos, sem comprometer a integridade da monocamada⁹.

Diante da possibilidade conferir atividade antimicrobiana à superfície do titânio ou até mesmo algum nível de bioatividade à um metal considerado inicialmente inerte; este estudo realizou análise através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e caracterização em Interferometria a laser de superfícies de óxido de titânio em três etapas diferentes do processo de silanização que precedem a associação de peptídeos à esta superfície com objetivo de analisar e caracterizar o padrão de uniformidade e parâmetros de rugosidade encontrados.

REVISÃO DE LITERATURA

Diversas modificações da superfície dos implantes osseointegráveis foram desenvolvidas usando-se métodos subtrativos e aditivos. Dentre estes métodos, os mais utilizados são o jateamento de partículas, o ataque ácido e a anodização. Estas técnicas aumentam a rugosidade e melhoram o sucesso clínico com taxas de cicatrização mais rápidas e potencialmente menores intervalos de tempo para carregamento. No entanto, cada procedimento gera uma superfície rugosa com características topográficas ligeiramente diferentes, mesmo quando possuem valores iguais em suas médias aritméticas de rugosidade (Ra). Além disso, como resultado dessas modificações, a molhabilidade e as características químicas da superfície do implante também são frequentemente alteradas e podem mudar drasticamente a resposta celular inicial a um material implantado¹⁰.

A maior parte dos trabalhos disponíveis na literatura que analisam a influência da rugosidade na osseointegração utilizam, convencionalmente, somente os valores de Ra. Alguns trabalhos correlacionam o valor de Ra com outras propriedades das superfícies, como a molhabilidade, adesão das células *in vitro* e adsorção de proteínas. Além do fato da escolha de Ra como parâmetro de análise da rugosidade não ser justificada nestes trabalhos, a avaliação isolada de um parâmetro da rugosidade do implante não constitui a análise ideal para sua caracterização, pois superfícies com valores semelhantes de Ra podem apresentar morfologias diferenciadas. Portanto, há necessidade de correlacionar entre si os diversos parâmetros que caracterizam a rugosidade, bem como analisar a interferência com outras propriedades da superfície dos implantes¹¹.

Os parâmetros para análise e caracterização de rugosidade caracterizam a superfície implantar. No entanto, o papel específico de cada parâmetro da rugosidade na osseointegração ainda não é conclusivo¹¹. Uma melhor avaliação da rugosidade e adesão celular, pode ser obtida através da associação dos valores de pelo menos um parâmetro de altura, um espacial, e um híbrido¹².

A rugosidade da superfície pode ser dividida em três níveis, dependendo da escala dos recursos: topologias macro, micro e nano-dimensionadas¹³. O nível macro é definido para características topográficas como estando na faixa de milímetros a dezenas de microns. Esta escala está diretamente relacionada com a geometria do implante, com parafusos rosqueados e tratamentos de superfície macroporosa dando rugosidade superficial superior a 10 μm . A alta rugosidade resulta em intertravamento mecânico entre a superfície do implante e o osso adjacente. No entanto, um grande risco com alta rugosidade da superfície pode ser um aumento na peri-implantite¹⁴.

A rugosidade micrométrica dos implantes dentários está na faixa de 1–10 μm . Esta faixa de rugosidade maximiza o intertravamento entre o osso mineralizado e a superfície do implante. Nestas superfícies, as irregularidades permitem que células osteogênicas se unam e depositem osso, produzindo a interface osso-implante e por isso considera-se que as microrrugosidades atuam no nível celular da osseointegração¹⁵.

Perfis de superfície na faixa nanométrica desempenham um papel importante na adsorção de proteínas, adesão de células osteoblásticas e na taxa de osseointegração. No entanto, a rugosidade da superfície reproduzível na faixa nanométrica é difícil de produzir com tratamentos químicos. Além disso, a nano topografia de superfície ideal para adsorção seletiva de proteínas levando à adesão de células osteoblásticas e aposição óssea rápida ainda é desconhecida¹⁴.

Vários métodos foram desenvolvidos para criar uma superfície rugosa e melhorar a osseointegração de implantes dentários de titânio. Esses métodos usam pulverização de plasma de titânio, jateamento com partículas cerâmicas, ataque ácido e anodização^{10, 14}.

As técnicas de modificação da superfície podem ser utilizadas individualmente ou combinadas e podem ser classificadas em três categorias: físicas, químicas e biológicas².

Superfícies nano rugosas com características semelhantes aos receptores e proteínas da membrana celular têm um papel crucial na melhoria do desempenho do implante e da osseointegração. Em uma condição de nanoescala, os receptores de membrana celular, integrinas e proteínas estão envolvidos e melhoram a qualidade geral da osseointegração e outras reações biológicas entre osso e implante¹⁶.

Embora os óxidos metálicos possam diferir em diversas propriedades físicas e químicas; muitos deles compartilham o potencial de funcionalização da superfície por meio da reatividade da superfície grupos -OH ligados como pontos de ancoragem para a formação de monocamadas densamente empacotadas. A ativação pode ser obtida por ataque a úmido, ataque a seco e ativação por plasma. A superfície terminada por grupos hidroxila torna possível a ligação com outras moléculas por meio de reações de condensação⁹.

Diversos grupos funcionais reagem com a hidroxila terminal, levando à formação de camadas conhecidas como *self assembled monolayers (SAM's)* ou monocamadas auto-organizadas. Através de interações químicas específicas, moléculas orgânicas podem se organizar espontaneamente sobre vários tipos de superfície¹⁷.

A preparação de monocamadas de silano a partir de solução é padronizada atualmente para obter de forma mais reprodutível e rápida SAM's de silano através da imersão de um metal em uma solução do precursor APTES (3-aminopropil)triétoxissilano em diferentes concentrações e temperaturas. O APTES é comumente usado para obter superfícies terminadas em amina que são aplicadas para promover adesão de proteínas e crescimento celular em implantes biológicos⁹.

A reação tem o potencial de formar um único material óxido modificado ou funcionar como um intermediário na ligação de ligantes orgânicos a superfícies de óxido⁴.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das Amostras

O preparo das amostras foi realizado em conjunto no laboratório de Biomateriais -SE/8 e Laboratório de Processos Biotecnológicos - SE/5 do Instituto Militar de Engenharia, RJ.

Um total de 76 amostras foi dividido em quatro grupos com 19 discos de titânio grau 4, medindo 6X2 mm e inicialmente com superfície polida. Os grupos formados foram: Titânio Silanizado e com HBP (Ti sip), Titânio Silanizado e sem HBP (Ti si), Titânio com HBP sem silanização prévia (Ti p) e o controle negativo através do grupo de Titânio sem silanização e sem HBP (Ti).

Uniformização das Superfícies

Todos os discos foram submetidos ao mesmo condicionamento ácido com solução composta por H_2SO_4 / HF / HCl e para formar uma superfície microrrugosa uniforme semelhante a microtextura dos implantes osseointegráveis disponíveis no mercado. Após esse tratamento, os discos foram lavados com água destilada, secos em N_2 .

Ativação das Amostras

As amostras dos grupos Ti sip e Ti si foram ativadas com tratamento alcalino por imersão em 20 ml de solução com NaOH 5M durante 8h à temperatura de 60°C para formação dos grupos funcionais hidroxila (OH^-) necessários para a união covalente entre o titânio e o silano.

Após essa etapa foram lavadas com água destilada por 30 min e secas individualmente em N_2 . Apesar desta etapa tornar possível a ligação do silano na superfície do titânio, ela tem como possível consequência a formação de uma camada de titanato de sódio amorfa na superfície do metal, que se imersa em fluido com condições iônicas ideais, poderá sofrer cristalização em apatita, conferindo assim, algum nível de bioatividade ao material.

Silanização

Para o procedimento de silanização são necessários um silano, uma base e um solvente. O silano escolhido foi o CPTES de 3(cloropropil)-trietoxissilano devido a presença do grupo terminal cloro em sua porção organofuncional, o que facilita a interação do silano com o peptídeo à um PH de 11. O solvente escolhido foi o pentano anidro e a base a N,N-diisopropiletilamina (DIPEA).

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-AldrichBrasil. Para o processo de silanização, as amostras ativadas (Ti sip e Ti si) foram imersas em solução contendo 7 ml de pentano anidro, 1,2 ml de 3(cloropropil)-trietoxissilano e 0,6ml da base N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) sob uma atmosfera saturada de N_2 durante 1 h. Ao final deste período, as amostras foram lavadas três vezes com água destilada e secas com nitrogênio.

Imobilização do Peptídeo de Ligação à Hidroxiapatita

A funcionalização das superfícies das amostras silanizadas através da associação do HBP foi realizada no R-Crio Células-Tronco, Campinas, SP através do gotejamento nas amostras silanizadas de 10 μL de solução contendo o peptídeo pVTK 0,4mM dissolvido em carbonato de sódio (Na_2CO_3) na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$.

Amostras analisadas

Amostras preparadas para imobilização de HBP na superfície do titânio através do método de silanização, foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e caracterizadas em Interferometria a laser Zygo no Laboratório de Biomateriais do Instituto Militar de Engenharia (IME), durante três etapas diferentes do processo.

A molhabilidade foi quantificada pela medida do ângulo de contato com água destilada. Neste trabalho foi empregado o goniômetro FTA100 (First Ten Angstroms, Portsmouth, VA, USA). Quanto menor o ângulo de contato, maior a molhabilidade. A redução do ângulo de contato indica que a superfície é mais hidrofílica.

No presente trabalho foram analisadas duas amostras do grupo Ti, denominadas agora por subgrupo A₁. No grupo Ti si, duas amostras foram analisadas após ativação por condicionamento alcalino com NaOH 5M, denominadas subgrupo A₂ e outras duas após a etapa de imersão na solução contendo silano, denominadas subgrupo A₃.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o condicionamento ácido com solução composta por H₂SO₄ / HF / HCl, todos os discos formaram uma superfície microrrugosa com parâmetro Ra aproximadamente entre 1 e 2 µm semelhante a microtextura dos implantes osseointegráveis disponíveis no mercado, conforme verificado nas figuras 1 e 2 que confirmou a uniformidade do tratamento realizado ao longo de toda a sua extensão.

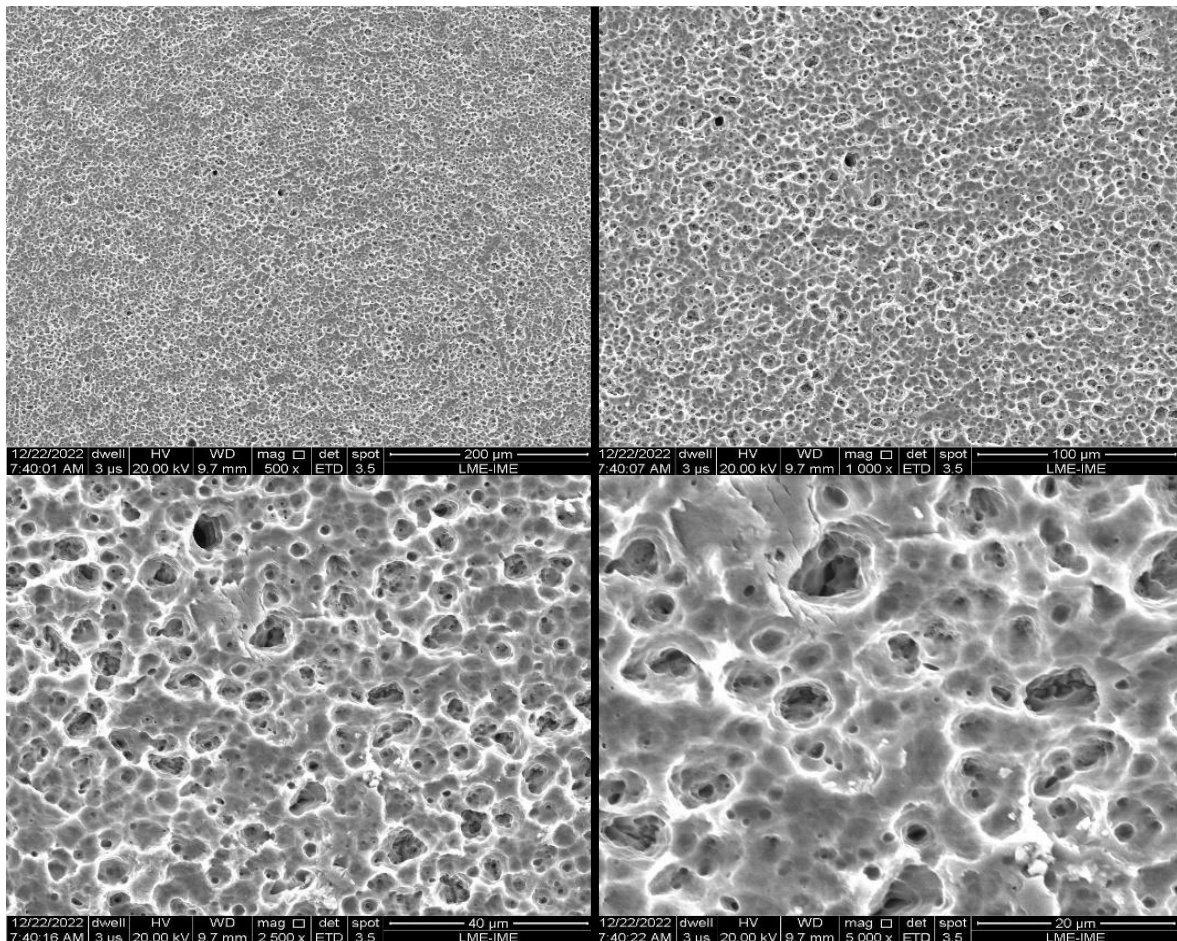


Figura 1: MEV da superfície da amostra de titânio do subgrupo A₁ após condicionamento ácido. Aumento de 500X, 1000X, 2500X, 5000X.

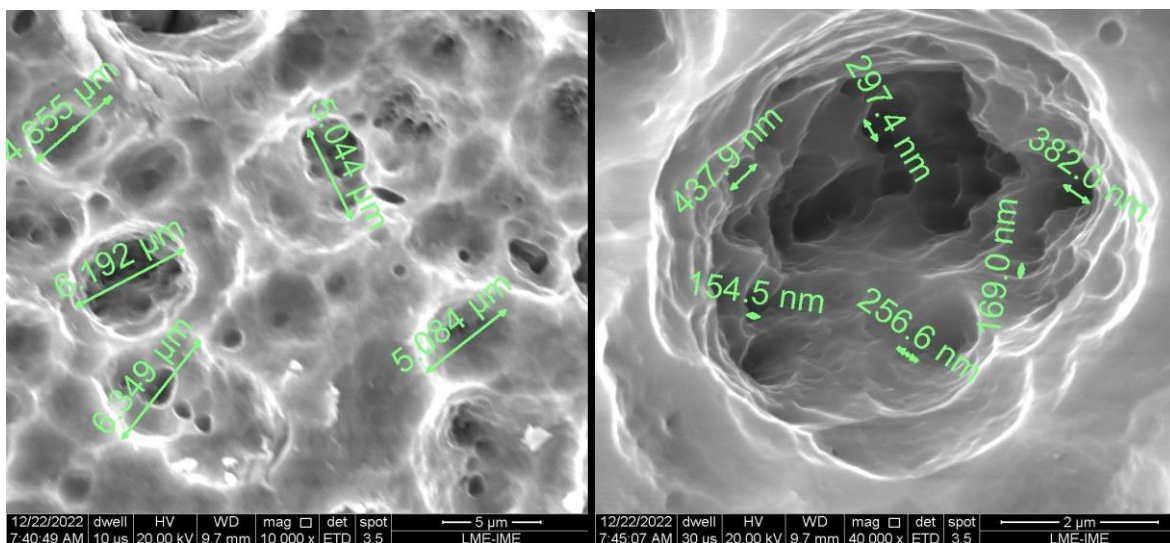


Figura 2: MEV da superfície da amostra de titânio do subgrupo A₁ após condicionamento ácido. Aumento de 10.000X, 40.000X.

A superfície de duas amostras ativadas através do condicionamento com NaOH (figura 3) e de duas amostras submetidas à incorporação do silano (figura 4) também foram analisadas em MEV e caracterizadas através do Interferômetro a laser Zygo, confirmando a uniformidade da microtextura superficial e parâmetros de rugosidade alcançados após o condicionamento ácido.

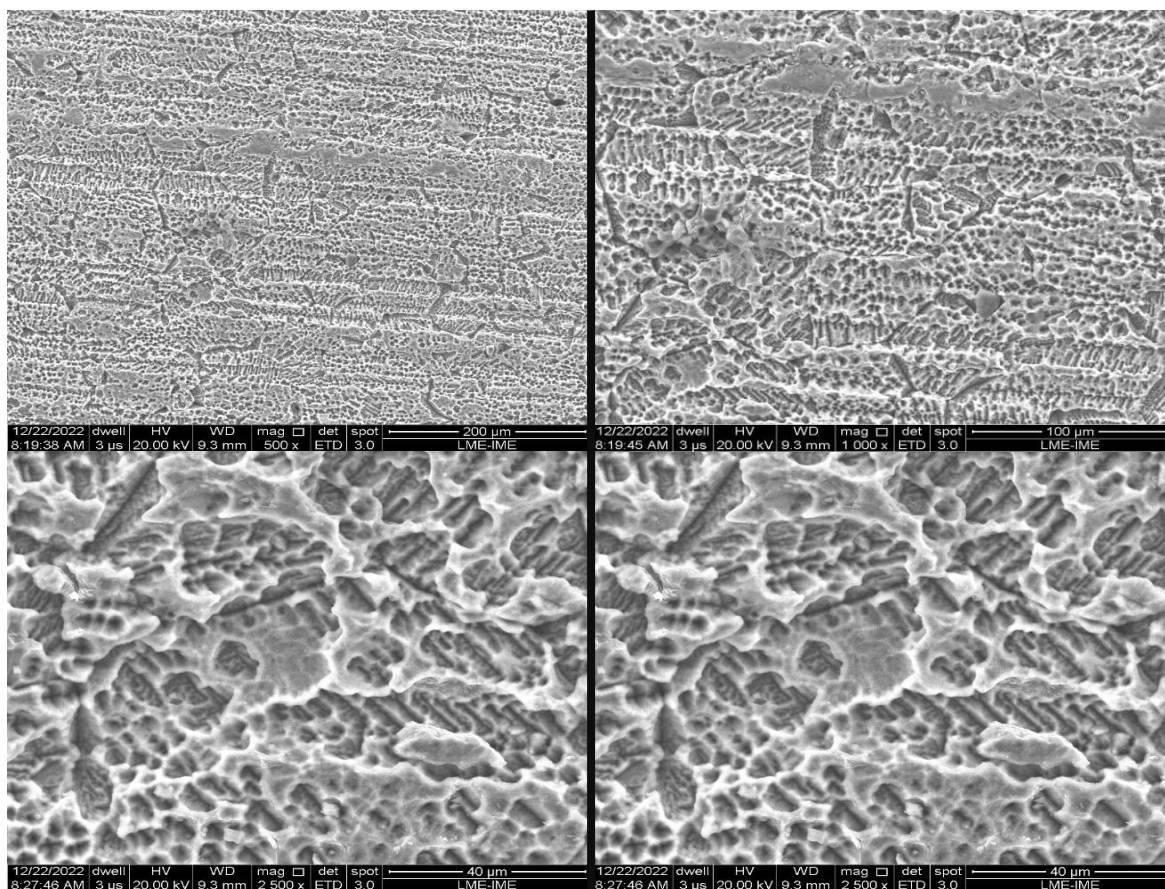


Figura 3: MEV da superfície da amostra de titânio do subgrupo A₂ após condicionamento alcalino. Aumento de 500X, 1000X, 2500X, 5000X.

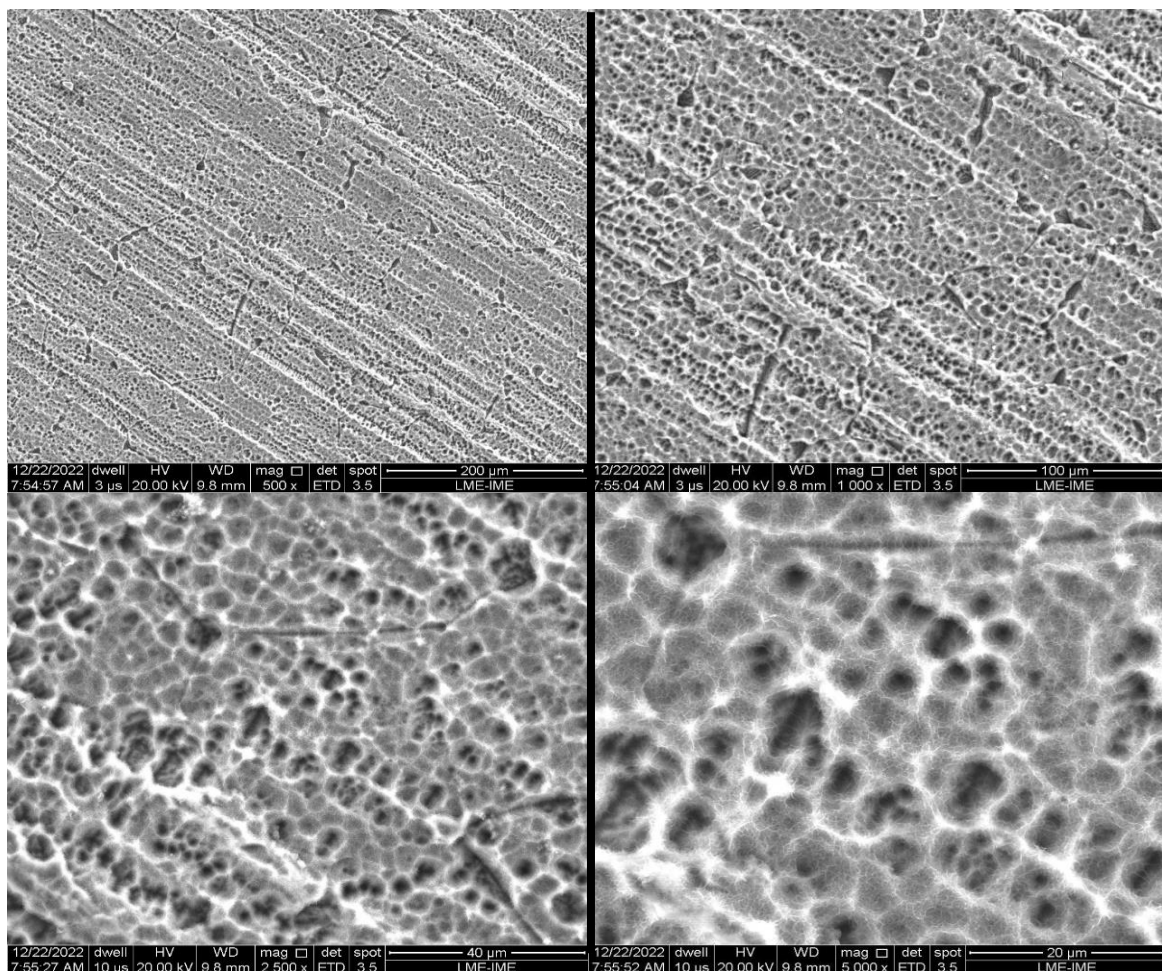


Figura 4: MEV da superfície da amostra de titânio do subgrupo A₃ após silanização. Aumento de 500X, 1000X, 2500X, 5000X.

A análise em MEV dos subgrupos A₂ e A₃ em maior aumento, especialmente em 40.000X (figuras 5 e 6), evidenciou superfícies com características nanométricas ao longo da superfície, o que pode significar uma melhor adsorção de proteínas e um aprimoramento na osseointegração de implantes

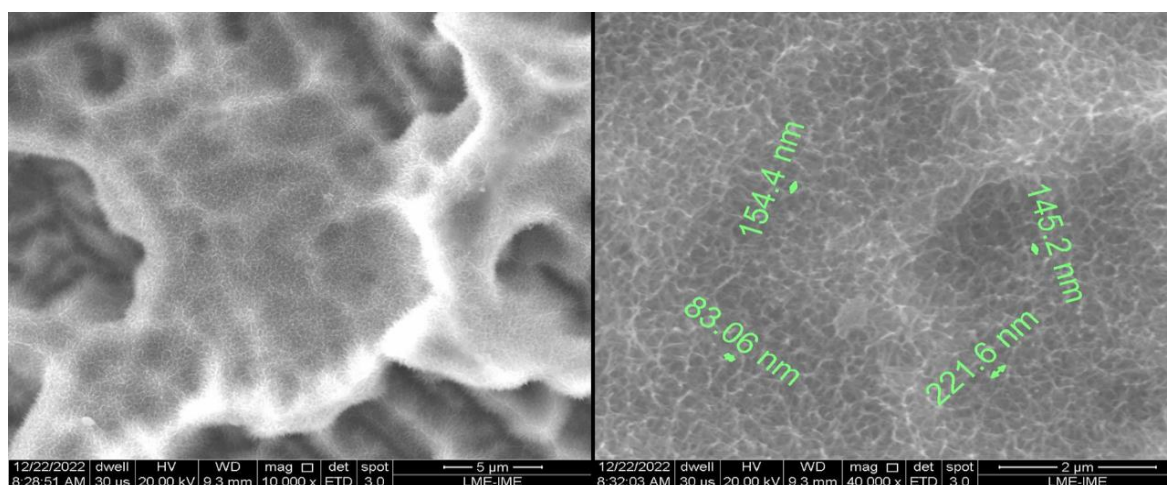


Figura 5: MEV da superfície da amostra de titânio do subgrupo A₂ após condicionamento alcalino. Aumento de 10.000X, 40.000X.

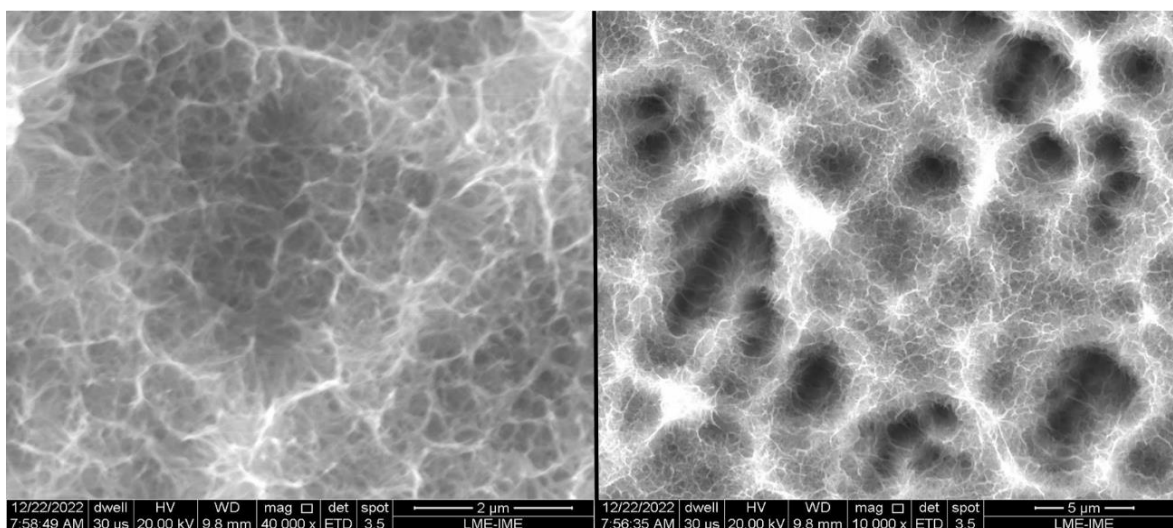


Figura 6: MEV da superfície da amostra de titânio do subgrupo A₂ após silanização. Aumento de 10.000X, 40.000X.

A caracterização das superfícies em Interferômetro a laser Zygo, das amostras dos três subgrupos estudados (figuras 7, 8 e 9; tabelas 1, 2 e 3) mostrou uma superfície com parâmetros de rugosidade compatíveis com os implantes osseointegráveis comerciais, inclusive com média do parâmetro Ra entre 1 e 2 µm nos três subgrupos analisados.

Pode-se observar que não houve diferença significativa entre as médias dos parâmetros de rugosidade entre os subgrupos estudados. Entretanto, verificou-se diferença estatística entre os demais grupos.

Um estudo comparativo em amostras de titânio com superfície anodizadas, com ataque ácido e fluoreto sobre o valor de Ra e o ângulo de contato, concluíram que os ângulos de contato foram influenciados por Ra nos grupos de amostras. Apesar da pequena diferença entre Ra dos grupos, a molhabilidade apresentou a tendência de reduzir com o aumento de Ra¹⁸.

Diferentes tratamentos aplicados com objetivo de aumentar a rugosidade superficial e a molhabilidade das amostras de titânio, e analisados com medidas de perfilometria e ângulo de contato, PORRELLI et al. (2021) mostraram que a molhabilidade não é o parâmetro crítico para adesão e proliferação celular, e que a topografia da superfície desempenha o papel principal¹⁹.

No presente estudo, os maiores valores médios de Ra foram encontrados no subgrupo A₂, ou seja, após a etapa de tratamento alcalino, quando comparado com os outros dois subgrupos. No entanto, diferente do relatado por COUTINHO & ELIAS (2010), o subgrupo que apresentou maiores valores médios de Ra, também apresentou menores valores de ângulo de contato e maior molhabilidade.

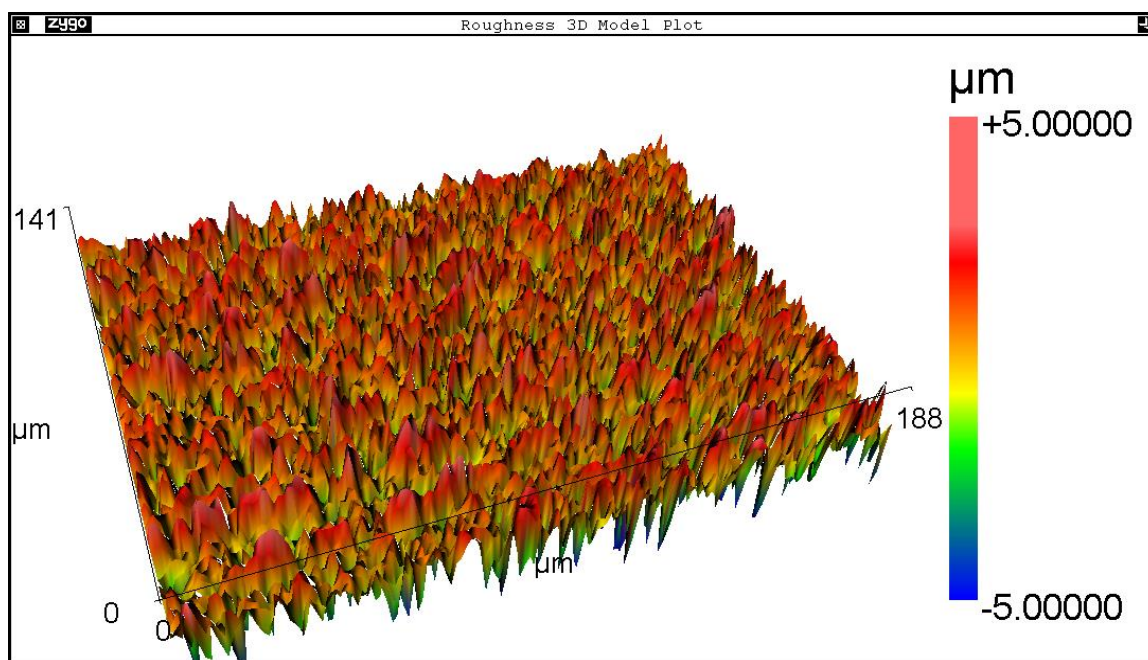


Figura 7: Imagem 3D da microtopografia da superfície da amostra após condicionamento ácido - Interferômetro Zygo

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

Tabela1: Parâmetros de rugosidade em cinco regiões diferentes na superfície da amostra após condicionamento ácido - Interferômetro Zygo

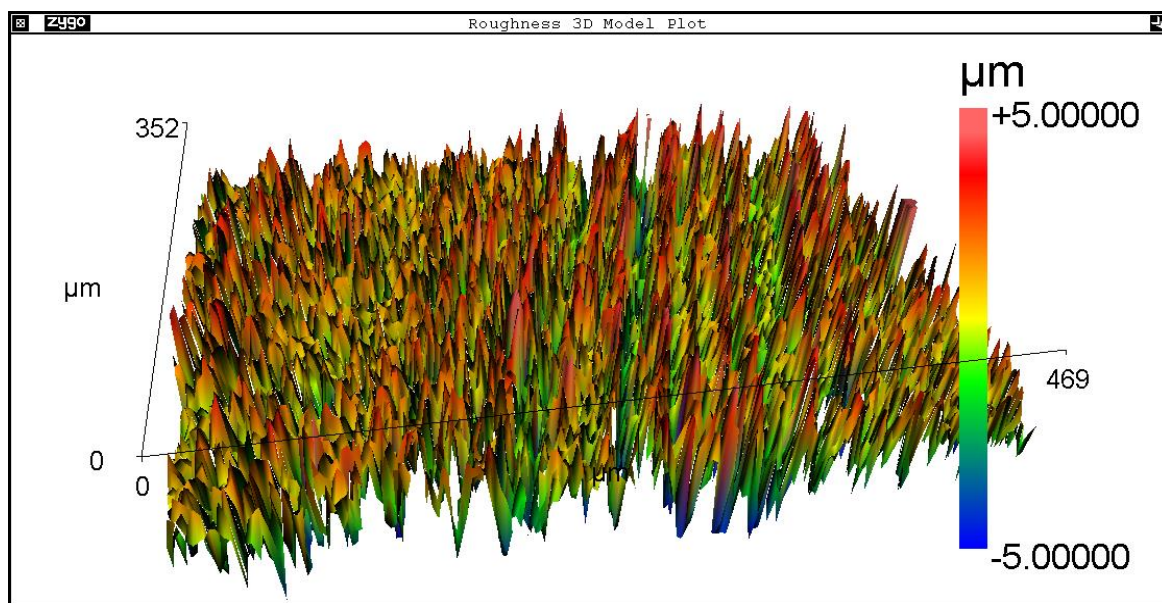


Figura 8: Imagem 3D da microtopografia da superfície da amostra após condicionamento alcalino - Interferômetro Zygo

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

Tabela 2: Parâmetros de rugosidade em cinco regiões diferentes na superfície da amostra após condicionamento alcalino - Interferômetro Zygo

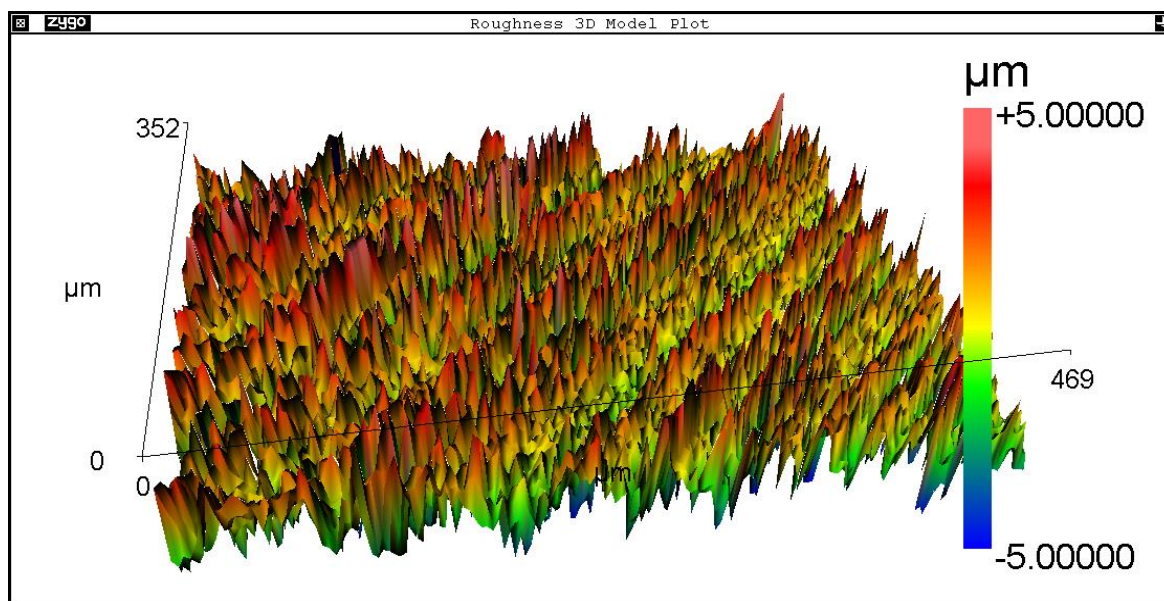


Figura 9: Imagem 3D da microtopografia da superfície da amostra após silanização - Interferômetro Zygo

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

Tabela 3: Parâmetros de rugosidade em cinco regiões diferentes na superfície da amostra após silanização - Interferômetro Zygo

A molhabilidade quantificada pela medida do ângulo de contato com água destilada evidenciou menores valores nas superfícies dos subgrupos A₂ e A₃, fazendo com que as superfícies estudadas destas duas etapas, apresentem características mais hidrofílicas em comparação com as superfícies do subgrupo com somente o tratamento ácido (figura 10).



Figura 10: Molhabilidade das amostras dos subgrupos A₁ (A), A₂ (B) e A₃ (C).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados pode-se concluir que;

1. não houve diferença significativa entre as médias dos parâmetros de rugosidade entre as amostras com superfície nos subgrupos estudados que correspondem às três etapas do processo de silanização;
2. as amostras de todos os subgrupos estudados apresentaram valores de rugosidade média compatíveis com os parâmetros recomendados em estudos anteriores;
3. as amostras do subgrupo A₂ apresentaram molhabilidade significativamente superior às amostras com apenas o condicionamento ácido;
4. nas amostras estudadas, não foi observado a tendência da redução linear da molhabilidade com o aumento da rugosidade;
5. as características encontradas nas superfícies do titânio após etapas de condicionamento alcalino e silanização mantêm parâmetros de rugosidade adequados e sugerem ainda uma melhora na molhabilidade, conferindo ainda maior hidrofilicidade à estas superfícies;
6. para melhor compreensão dos efeitos da funcionalização das superfícies de titânio na rugosidade e molhabilidade, é necessária a repetição dos mesmos testes após a associação de peptídeos para análise da superfície final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JEMAT AFIDA E GHAZALI, M. J. e. R. M. e. O. Y. Modificações de superfície e seus efeitos em implantes dentários de titânio. *BioMed research international*, v. 2015.
2. LIU, Y.; RATH, B.; TINGART, M.; ESCHWEILER, J. Role of implants surface modification in osseointegration: A systematic review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A, Wiley Online Library*, v. 108, n. 3, p. 470–484, 2020.
3. ZAVAGLIA CAC, . P. d. S. M. Biomateriais. Módulo de Referência em Ciência de Materiais e Engenharia de Materiais, 2016.
4. PESEK, Joseph J.; MATYSKA, Maria T. Methods for the modification and characterization of oxide surfaces. *Interface Science*, v. 5, n. 2, p. 103-117, 1997.
5. RYU, Du Yeol et al. A generalized approach to the modification of solid surfaces. *Science*, v. 308, n. 5719, p. 236-239, 2005.
6. LIU, Xuanyong; CHU, Paul K.; DING, Chuanxian. Surface nano-functionalization of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v. 70, n. 3-6, p. 275-302, 2010.
7. ZAFAR, Muhammad Sohail et al. Customized therapeutic surface coatings for dental implants. *Coatings*, v. 10, n. 6, p. 568, 2020.
8. SAFONOV, Vladimir et al. Modification of implant material surface properties by means of oxide nano-structured coatings deposition. *Applied surface science*, v. 310, p. 174-179, 2014.
9. PUJARI, Sidharam P. et al. Covalent surface modification of oxide surfaces. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 25, p. 6322-6356, 2014.
10. HOTCHKISS KELLY M E SOWERS, K. T. e. O.-N. R. Novo modelo comparativo in vitro de resposta celular osteogênica e inflamatória a implantes dentários.
11. LEITE, G. B.; FONSECA, Y. R.; GOMES, A. V.; ELIAS, C. N. Relação entre os parâmetros de rugosidade 3d e a molhabilidade do titânio com grãos micrométricos e sub-micrométricos. *Matéria (Rio de Janeiro), SciELO Brasil*, v. 25, 2020.
12. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research, Wiley Online Library*, v. 20, p. 172–184, 2009.
13. MATOS, G. R. M. Surface roughness of dental implant and osseointegration. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery, Springer*, v. 20, n. 1, p. 1–4, 2021.

14. GUÉHENNEC, L. L.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P.; AMOURIQ, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials*, Elsevier, v. 23, n. 7, p. 844–854, 2007.
15. WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; ANDERSSON, B.; KROL, J. A histomorphometric study of screw-shaped and removal torque titanium implants with three different surface topographies. *Clinical oral implants research*, Wiley Online Library, v. 6, n. 1, p. 24–30, 1995.
16. LI JIE E ZHOU, P. e. A. S. e. S. H. Procedimentos inovadores de modificação de superfície para obter ligas e implantes biomédicos baseados em ti micro/nano-graduados. *Revestimentos*, Instituto Multidisciplinar de Publicação Digital, v. 11.
17. FREIRE, Renato S.; PESSOA, Christiana A.; KUBOTA, Lauro T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Química Nova*, v. 26, p. 381-389, 2003.
18. COUTINHO, Murilo Pereira; ELIAS, Carlos Nelson. Rugosidade e molhabilidade do titânio usado em implantes dentários com superfícies tratadas. *Revista brasileira de odontologia*, v. 66, n. 2, p. 234, 2010.
19. PORRELLI, Davide et al. Polyetheretherketone and titanium surface treatments to modify roughness and wettability–improvement of bioactivity and antibacterial properties. *Journal of Materials Science & Technology*, v. 95, p. 213-224, 2021.