

Artigo

Superfícies de Micro-Nano Titânio sem Resíduos Através de Jato de Titânio e Gravação com Ácido Único: Uma Alternativa mais Limpa

Artiom Lijnev ¹, José Eduardo Maté Sánchez de Val ^{1,*}, Jeevithan Elango ¹, Carlos Pérez-Albacete Martínez ¹, José Manuel Granero Marín ², Antonio Scarano ³ e Sergio Alexandre Gehrke ^{4,*}

- ¹ Departamento de Engenharia de Biomateriais, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidad Católica de Murcia UCAM, Campus de los Jerónimos 135, 30107 Murcia, Espanha; alijnev@ucam.edu (A.L.); jelango@ucam.edu (J.E.); cperezalbacete@ucam.edu (C.P.-A.M.)
 - ² Departamento de Implantologia, Faculdade de Medicina e Odontologia, UCAM-Universidade Católica San Antonio de Murcia, 30107 Murcia, Espanha; jmgranero@ucam.edu
 - ³ Departamento de Tecnologias Inovadoras em Medicina e Odontologia, Universidade de Chieti-Pescara, 66013 Chieti, Itália; ascarano@unich.it
 - ⁴ Departamento de Implantologia, Bioface/Postgrados en Odontología/Universidad Católica de Murcia, Montevideo 11100, Uruguai
- * Correspondência: jemate@ucam.edu (J.E.M.S.d.V.); sergio.gehrke@hotmail.com (S.A.G.)

Resumo

Contexto: Os tratamentos de superfície tradicionais de jateamento de areia grossa gravados com ácido (SLA) utilizam frequentemente jato de alumina (Al_2O_3), que pode deixar partículas residuais incorporadas nas superfícies dos implantes, comprometendo potencialmente a biocompatibilidade e a osseointegração. Este estudo investiga uma alternativa livre de contaminação: jato de partículas de dióxido de titânio (TiO_2) seguido de gravação com ácido clorídrico (HCl), com o objetivo de gerar uma superfície micro-nano-texturizada mais limpa e hierárquica. **Métodos:** Os discos de titânio de grau IV foram tratados apenas com jateamento de areia de TiO_2 ou com uma etapa adicional de gravação com HCl. As superfícies foram analisadas por microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (SEM), medições do ângulo de contato e perfilometria. Os osteoblastos hFOB foram cultivados para avaliar a adesão, a proliferação, a atividade metabólica e a morfologia. **Resultados:** O tratamento combinado produziu uma micro-nano estrutura mais homogênea com uma rugosidade significativamente maior e uma química de superfície mais limpa. A proliferação de osteoblastos e a atividade metabólica foram notavelmente melhoradas no grupo TiO_2 e HCl. As imagens SEM mostraram uma estrutura citoesquelética mais organizada e filopódios pronunciados às 72 h. **Conclusões:** O jato de titânio combinado com a gravação com HCl produz uma modificação da superfície econômica e sem contaminação, com respostas celulares promissoras na fase inicial. Esta abordagem representa uma alternativa mais segura e eficaz ao tratamento convencional de SLA.

Palavras-chave: superfície do implante; micro e micro-nano superfícies; estudo in vitro; osteoblastos



Editor Acadêmico: Steven L. Goudy

Recebido: 26 de maio de 2025

Revisado: 25 de junho de 2025

Aceito: 04 de julho de 2025

Publicado: 05 de julho de 2025

Citação: Lijnev, A.; Maté Sánchez de Val, J.E.; Elango, J.; Pérez-Albacete Martínez, C.; Marín, J.M.G.; Scarano, A.; Gehrke, S.A. Superfícies de Micro-Nano Titânio sem Resíduos Através de Jato de Titânio e Gravação com Ácido Único: Uma Alternativa mais Limpa. *Bioengineering* **2025**, *12*, 735. <https://doi.org/10.3390/bioengineering12070735>

Direitos Autorais: © 2025 pelos autores. Licenciado MDPI, Basileia, Suíça. Este artigo é um artigo de acesso aberto distribuído nos termos e condições da licença Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introdução

O sucesso clínico a longo prazo dos implantes dentários depende fundamentalmente de uma osseointegração eficaz, definida como a ligação estrutural e funcional direta entre o osso vivo e a superfície do implante [1]. Um fator determinante deste processo reside na topografia e na química da superfície do implante, que, em conjunto, regem a adsorção precoce de proteínas, a adesão e a proliferação de células e a subsequente integração dos tecidos [2].

A relevância clínica da qualidade da superfície do implante reside na sua influência direta na cascata biológica após a implantação. Imediatamente após a colocação, a superfície do implante interage com as proteínas do sangue, que condicionam a superfície e medeiam os eventos celulares subsequentes [2,3]. A topografia à escala micro e nanométrica, juntamente com a química da superfície, desempenha um papel decisivo na modulação do comportamento das células, incluindo a adesão, a disseminação, a proliferação e a diferenciação - em especial dos osteoblastos, que são fundamentais para a regeneração óssea e a osseointegração [4,5]. Foi demonstrado que as superfícies com rugosidade controlada e elevada energia de superfície aumentam a fixação inicial das células e promovem a organização do citoesqueleto e as vias de sinalização que favorecem a proliferação e a maturação [5,6]. Clinicamente, uma proliferação celular mais rápida e mais robusta pode traduzir-se num melhor contacto osso-implante (BIC), em tempos de cicatrização reduzidos e numa maior estabilidade do implante a longo prazo [7]. Portanto, projetar superfícies que otimizem essas respostas celulares é fundamental para melhorar as taxas de sucesso do implante, especialmente em pacientes com qualidade óssea comprometida.

Nas últimas duas décadas, a técnica de SLA tornou-se uma das estratégias de modificação de superfície mais difundidas devido à sua capacidade comprovada de criar uma topografia hierarquicamente rugosa que apoia a atividade dos osteoblastos e o contato osso-implante [8–10]. As superfícies de SLA são normalmente geradas utilizando jato de partículas de alumina (Al_2O_3) de grão grosso, seguido de uma gravação com ácido duplo, normalmente com HCl e ácido sulfúrico (H_2SO_4). Embora este método tenha demonstrado eficácia clínica, surgiram várias limitações importantes, tanto de uma perspectiva biológica como industrial [11–13].

Embora este método tenha demonstrado eficácia clínica, surgiram várias limitações importantes, tanto de uma perspectiva biológica como industrial [14]. Estes restos não são bioinertes e podem provocar reações indesejáveis de corpos estranhos, incluindo inflamação localizada, encapsulamento fibroso ou comprometimento da aposição óssea [15–17]. Mesmo após a limpeza por ultra-sons ou tratamentos ácidos adicionais, a remoção completa da contaminação por Al_2O_3 é frequentemente impossível [14,18].

Em segundo lugar, a utilização de protocolos de dupla gravação ácida, embora eficaz na produção de características à escala nanométrica e no aumento da energia de superfície, introduz reagentes tóxicos, nomeadamente H_2SO_4 , no fluxo de trabalho de fabricação. Isto não só aumenta o custo e o nível de perigo, mas a remoção do H_2SO_4 do processo simplifica a produção e reduz os requisitos de gestão química. Pode também conduzir a uma gravação não uniforme e a uma variabilidade entre lotes [19,20]. Além disso, o H_2SO_4 introduz efeitos corrosivos mais fortes, podendo afetar a integridade do titânio subjacente ou aumentar a libertação de íon [21].

À luz dessas desvantagens, tratamentos de superfície alternativos que eliminam riscos de contaminação, simplificam o processamento ácido e promovem práticas de fabricação mais sustentáveis estão sendo cada vez mais explorados. Uma dessas estratégias é o jato de partículas de titânio, que utiliza partículas biocompatíveis de TiO_2 em vez de alumina. Como o titânio é o mesmo elemento que o substrato de base, quaisquer partículas residuais não comprometem a biocompatibilidade nem desencadeiam cascatas inflamatórias [18]. Além disso, a substituição da dupla gravação ácida por uma gravação numa única fase utilizando HCl proporciona um método mais seguro, mais limpo e mais econômico para gerar topografia à escala nanométrica, mantendo simultaneamente um elevado desempenho biológico [22].

Este estudo tem como objetivo avaliar uma abordagem de tratamento de superfície que combina o jateamento de partículas de TiO_2 com a gravação de ácido de HCl numa única etapa. O objetivo é determinar se este método oferece uma superfície quimicamente limpa, biocompatível e topograficamente otimizada, capaz de melhorar as respostas osteoblásticas iniciais relevantes para a osseointegração.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação da Amostra

Um total de 40 discos foram fabricados pela Implacil/Osstem (São Paulo, Brasil) utilizando o mesmo titânio puro de grau IV empregue na produção de implantes dentários. O processo de fabricação obedeceu à norma ASTM F67 estabelecida pela American Society for Testing and Materials (ASTM) [23]. Foram criados dois grupos experimentais (n = 20 discos por grupo):

Grupo Superfície 1 - Os implantes foram submetidos a jateamento de areia com micropartículas de TiO₂ disponíveis no mercado (150 ± 10 µm). O jateamento foi efetuado sob pressão de 0,7 MPa, através de um bocal de 5 mm a uma distância fixa de 10 mm, perpendicular (90° de incidência), durante 20 s por disco, utilizando movimentos circulares de varredura para assegurar uma cobertura uniforme. Estes parâmetros foram selecionados com base em testes-piloto internos e apoiados pela literatura, que refere que as dimensões das partículas de TiO₂ entre 106 e 180 µm a pressões de 0,6-0,8 MPa produzem uma micro-rugosidade moderada a elevada (Sa ≈ 0,7-1,3 µm), ideal para a atividade osteoblástica [24] [24]. Por exemplo, o jateamento com partículas de TiO₂ de 106-180 µm produziu Sa ≈ 1,30 µm, conseguindo uma maior proliferação e diferenciação de osteoblastos [25]. A pressão escolhida e a distância do bocal fornecem energia cinética suficiente para deformar de forma reproduzível a superfície de titânio sem induzir delaminação ou formação excessiva de crateras.

Grupo Superfície 2 - Os implantes foram submetidos ao mesmo procedimento de jateamento de areia que o grupo Superfície 1, após o que foram submetidos a um condicionamento ácido com HCl a 35%, dando origem a uma superfície denominada Superiore (Implacil/Osstem, São Paulo, Brasil).

Todos os discos, cada um com 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura, foram submetidos aos mesmos processos de lavagem, descontaminação e esterilização que os aplicados aos implantes dentários disponíveis no mercado (Figura 1).



Figura 1. Imagem representativa dos discos utilizados: (**esquerdo**) superfície tratada com jateamento de areia de TiO₂; (**direito**) superfície tratada com tratamento combinado de TiO₂ e HCl.

Para os procedimentos experimentais, o número de discos por grupo utilizado foi o seguinte: Caracterização da superfície (n = 8), cultura de células *in vitro* (n = 12).

2.2. Método de Caracterização da Superfície

2.2.1. Método de Topografia e Morfologia de Superfície

Foi utilizado um microscópio de força atômica (AFM, NaniteAFM, Nanosurf, Bracknell, Grã-Bretanha) para estudar a topografia da superfície. Os exames foram efetuados em modo de toque em locais aleatórios com uma área de 50 µm², utilizando uma cabeça de varredura de 5 µm² a uma velocidade de varredura inferior a 1 Hz. Durante o processo de varredura, foram ajustados vários parâmetros para obter uma resolução de imagem melhorada. Além disso, para a

determinação da rugosidade média registada (R_a), foram também medidas a altura máxima média do perfil (R_z), a rugosidade média da raiz quadrada (R_q) e a rugosidade máxima do pico ao vale (R_{max}).

Outras medições de rugosidade foram conduzidas usando um perfilômetro de contato (KLA Alpha Step D500). Foi utilizada uma ponta de contato cônica de diamante com 5 μm de raio para analisar a superfície mantida a 90° da superfície com uma gama de forças de contato de 0,03-15 mg, uma gama de alturas máximas de 1200 μm e um comprimento de varredura de 30 mm. Os discos foram posicionados num ângulo de 90° em relação à direção de deslocação do perfilômetro, e foram efetuadas quatro medições consecutivas para estimar a rugosidade (R_a), utilizando a rugosidade média numérica para os cálculos.

As superfícies dos discos foram observadas por microscopia eletrônica de varredura em um (SEM- Hitachi S-3500N) com um detector LED, a uma tensão de aceleração de 5 kV. Os discos foram orientados para a horizontal e verticalmente em relação ao detector e foram capturados em várias ampliações: 1 K (10 μm), 6 K (2 μm) para a posição horizontal e 6 K (2 μm), 8 K (4 μm) para a posição vertical.

2.2.2. Teste de Ângulo de Contato

As medições do ângulo de contato com a água foram realizadas pelo método da gota em queda usando um instrumento de ângulo de contato (Goniômetro de Ângulo de Contato, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) à temperatura ambiente (com UR de 60%). Resumidamente, 5 μl de água desionizada foram descartados na superfície dos discos e o ângulo de contato foi medido aos 10 s de tempo. O ângulo de contato formado entre a tangente na interface líquido-disco foi registrado.

2.3. Teste de Cultura de Células In Vitro

A linhagem celular de osteoblastos humanos (hFOB) (ATCC-CRL-3602, LGC Standards, Barcelona, Espanha, N° de referência do pedido 70060968) foi usada para avaliar a biocompatibilidade das amostras. As células foram cultivadas de acordo com as informações de procedimento de manuseio fornecidas pela American Type Culture Collection (ATCC), utilizando meio completo Ham's F12 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (catálogo ThermoFisher n° 21041-025), composto por 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 0,3 mg/mL de Geneticina (sulfato G-418) (catálogo ThermoFisher n° 10131027) em uma incubadora com 5% de CO_2 a 34°C. Assim que as células atingiram aproximadamente 80–90% de confluência, o meio foi descartado e as células foram cuidadosamente lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para eliminar qualquer resíduo de meio ou células não ligadas. A tripsinização foi realizada adicionando 2 ml de 0,25% (*p/v*) de tripsina-0,53 mm EDTA a um balão T75, garantindo a dispersão da camada celular sob um microscópio invertido. As células isoladas foram submetidas a centrifugação e o sedimento resultante foi ressuspensão em meio fresco para a passagem celular. Cada vez, a contagem de células era determinada usando um contador de células Invitrogen automatizado (Condessa 3 FL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As passagens das células utilizadas para este experimento variaram da passagem 2 a 4.

2.3.1. Ensaio de Proliferação

A proliferação de células hFOB cultivadas nas amostras da superfície 1 e da superfície 2 foi avaliada em 24 e 72 h. As células foram inicialmente semeadas a uma densidade de 5×10^4 nas amostras e incubadas por 3 h, após as quais as amostras foram cobertas com meio. Após os períodos de incubação especificados, as células foram tripsinizadas, conforme descrito anteriormente, e 10 ml da suspensão celular foram transferidas para separar os tubos Eppendorf e tingidas com 10 ml de azul de tripano. A contagem total de células e a viabilidade foram

então avaliadas usando um contador de células Invitrogen automatizado. As células que foram semeadas sem amostras serviram como grupo de controle.

2.3.2. Método de Citotoxicidade

Para avaliação da atividade metabólica celular, as células foram semeadas e cultivadas na superfície do disco, como descrito anteriormente. O efeito do tratamento de superfície foi determinado usando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Resumidamente, foram adicionados 50 µl de reagente MTT (5 mg/1 ml de PBS) com meio fresco a cada poço no momento anteriormente estabelecido e incubado por 3 h. Em seguida, a solução MTT foi removida e 150 µl de DMSO foi adicionado a cada poço. O cristal de formazan formado foi quantificado espectrofotometricamente a 570 nm usando um leitor de microplacas multimodo ID3 Spectramax (Molecular Devices, LLC., San Jose, CA, EUA). As culturas celulares sem amostras foram consideradas o controle.

2.3.3. Teste de Morfologia Celular

A análise da morfologia celular foi realizada por SEM. As células foram cultivadas em discos com uma densidade de 5×10^4 , seguindo métodos descritos anteriormente e incubados por 24 e 72 h. As células não foram removidas enxaguando com PBS, desidratadas em uma série de etanol e fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA). Os discos que contêm células fixas foram armazenados em PBS até o processo de secagem do ponto crítico. Durante esta fase, as células foram desidratadas em um ambiente de CO₂ para preservar sua morfologia. Posteriormente, os discos foram revestidos com uma camada de ouro e observados sob SEM (SEM-Hitachi S-3500N, Hitachi, Tóquio, Japão) com ampliações de 1 K (10 µm), 3 K (2 µm).

Além disso, um novo conjunto de discos com células foi examinado para observar condições adesivas nas amostras usando um microscópio óptico (Leica, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), juntamente com a câmera digital e os filtros de fluorescência (xxx). Os discos que contêm células que foram fixadas por 24 e 72 h, conforme descrito anteriormente, foram lavados duas vezes com PBS e depois permeabilizados pela adição de Triton X-100 (1 mL por 100 mL de PBS) por uma duração de 10 min. O citoesqueleto de actina foi rotulado usando Faloidina-FITC, enquanto o DAPI foi empregado para manchar os núcleos.

2.4. Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em configurações independentes e os resultados foram obtidos em triplicado. Os dados foram apresentados como o desvio padrão médio (DP). Os testes de normalidade e variação igual foram realizados antes do teste. Diferentes grupos de dados foram comparados usando um teste ANOVA. A significância estatística foi considerada com uma probabilidade menor que 0,05 ($p < 0,05$) usando o SPSS 29.9 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA).

3. Resultados

3.1. Resultados da Caracterização da Superfície

3.1.1. Resultados de Topografia e Morfologia de Superfície

A modificação da superfície via tratamento com HCl induziu alterações notáveis na topografia em nano-escala dos discos de titânio de grau IV. A imagem AFM confirmou que ambos os grupos exibiram superfícies ásperas; No entanto, a rugosidade nano-escala observada nos discos jateados de areia foi notavelmente reduzida em comparação com o tratamento combinado. O último exibiu diferenças distintas na ondulação, sugerindo uma complexidade superficial aprimorada (Figura 2).

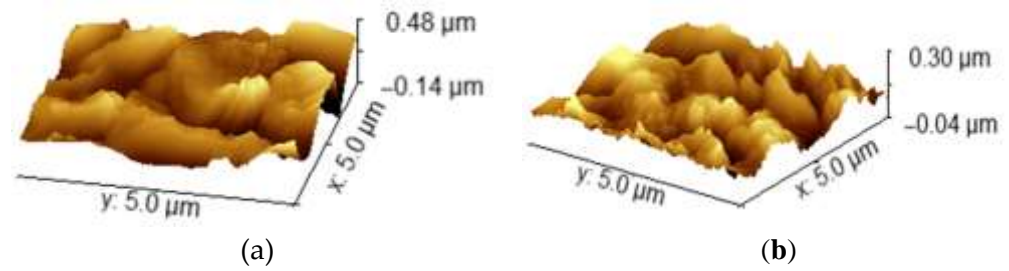


Figura 2. Microscopia de força atômica (AFM) de superfícies de titânio usadas no estudo: (a) superfície tratada com jateamento de areia de TiO₂; (b) superfície tratada com tratamento combinado de TiO₂ e HCl.

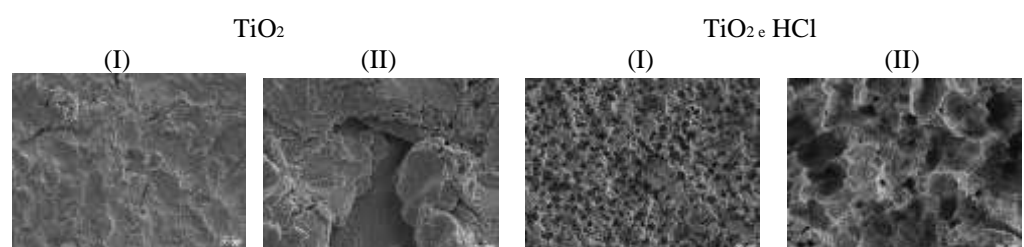
O grupo de tratamento combinado exibiu mais alterações pronunciadas, resultando em aumento da rugosidade da superfície e topografia não uniforme. Os valores de Ra em escala nano e micro-escala mostraram aumentos significativos, e a análise comparativa revelou diferenças significativas na Ra entre os grupos, conforme medido pelo AFM ($p < 0,05$) e perfilometria de contato ($p < 0,001$). No entanto, os valores AFM Rz não mostraram diferenças significativas entre os grupos. Por outro lado, o parâmetro Rq demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,02$), enquanto não foram observadas diferenças significativas no R_{max} (Tabela 1). Os perfis representativos do Perfilômetro de contato são apresentados anteriormente na Figura 2. A variabilidade provavelmente se deve à textura nano-escala heterogênea introduzida pelo jateamento e propagação ácida, o que cria picos e vales localizados em diferentes pontos de medição.

Tabela 1. Os valores médios de Ra, Rq, Rz e R_{max} das superfícies de titânio tratados com jateamento de areia e jateamento de areia seguidos pelo condicionamento ácido (média ± DP). O teste ANOVA revelou diferenças no Ra (AFM, $p < 0,05$; SP, $p < 0,001$), Rq (AFM, $p = 0,02$) de jateados de areia seguidos pelo ácido clorídrico, em comparação com amostras de jateamento de areia.

	Ra (nm, AFM)	Rz (nm, AFM)	Rq (nm, AFM)	R _{max} (nm, AFM)	Ra (nm, SP)
TiO ₂	850,9 ± 133,2	7,7 ± 3,7	1,1 ± 3,2	10,1 ± 12,1	922 ± 134,0
TiO ₂ e HCl	921,2 ± 143,0 *	8,1 ± 2,8	1,2 ± 4,1 *	10,5 ± 16,2	1,315 ± 165,0 *

AFM: Microscopia de força atômica; SP: Perfilômetro de contato; TiO₂: Jateamento de areia com partículas de titânio; HCl: Ácido clorídrico; *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A inspeção SEM revelou padrões de superfície distintos nas orientações horizontais e verticais. Em ampliações menores, o grupo de tratamento combinado exibiu uma maior densidade de micro-poços distribuídos uniformemente na superfície, enquanto o grupo jateado de areia apenas com jateamento de areia exibiu um padrão mais geométrico com estruturas semelhantes a cristais, poços menos uniformes e uma textura de superfície mais consistente (Figura 3). Essas observações se correlacionam com as variações nos valores de Ra entre os tratamentos de superfície. Após um exame mais detalhado, as depressões semelhantes a lacunas foram mais pronunciadas no grupo de tratamento combinado, provavelmente resultante da propagação ácida no disco de titânio. Por outro lado, o processo de jateamento de areia, sendo mais superficial, levou a menos depressões pronunciadas, juntamente com pequenas irregularidades não suportadas.



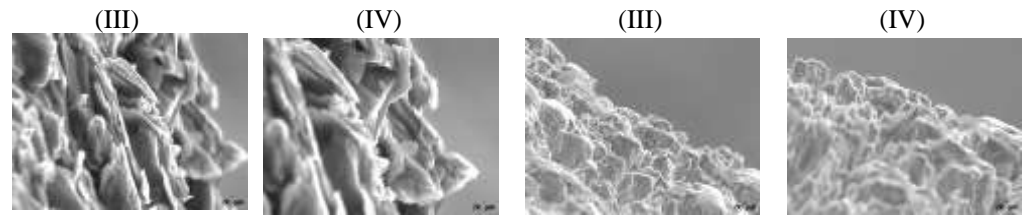


Figura 3. Representação esquemática de imagens de inspeção SEM ilustrando a morfologia da superfície horizontal e vertical em diferentes tratamentos de superfície em várias ampliações (I) 1 K; (II) 6 K; (III) 6 K;

(IV) 8 K. A vista horizontal apresenta uma perspectiva de cima para baixo da superfície do disco, destacando a distribuição geral de recursos da superfície, como poros e microestruturas. A vista vertical mostra uma morfologia transversal do tipo seção que revela a profundidade e os contornos das irregularidades da superfície, fornecendo informações sobre a rugosidade e a variação do perfil criadas por diferentes tratamentos de superfície.

A exploração vertical revelou características distintas da superfície entre os grupos de tratamento. O grupo tratado com HCl exibiu depressões semelhantes a lacunas que se estendem para protuberâncias laterais, enquanto o grupo de jateamento de areia exibiu uma morfologia da superfície mais laminar. A imersão no HCl levou consistentemente a limites de grãos visivelmente mais definidos, um efeito que se tornou cada vez mais pronunciado em vistas laterais em comparação com o jateamento de areia. Uma observação intrigante foi a presença de rachaduras dentro de certas protuberâncias, que eram claramente visíveis em perspectivas laterais.

3.1.2. Resultados do Ângulo de Contato

A molhabilidade superficial foi medida determinando os ângulos de contato da água (Figura 4). Após o jateamento de areia, a superfície do disco tornou-se hidrofóbica, pois o ângulo médio de contato atingiu o valor de $45^\circ \pm 3$. Verificou-se que a combinação de jateamento de areia e HCl aumentou a hidrofobicidade da amostra, com o valor do ângulo $40^\circ \pm 1$, e não houve diferenças estatísticas encontradas nas medições do ângulo de contato da água ($p > 0,05$).

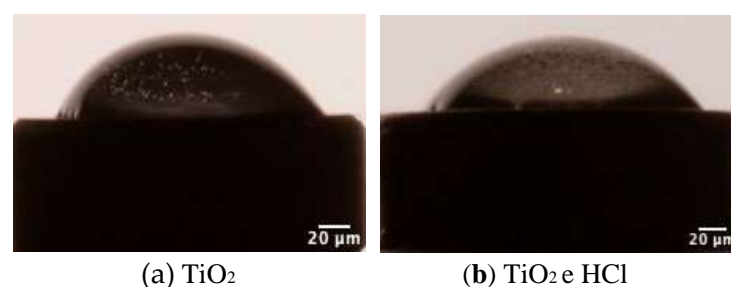


Figura 4. Representação esquemática do ângulo de contato da água de duas amostras de tratamento de superfície.

3.2. Resultados de Cultura de Células In Vitro

3.2.1. Resultados da Proliferação

A viabilidade e proliferação de hFOB em dois discos de titânio modificados na superfície às 24 e 72 h são mostrados nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Ambos os grupos exibiram um aumento significativo na proliferação celular do dia 1 ao dia 3 ($p < 0,001$). Durante as 24 horas iniciais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,09$). No entanto, em 72 h, o grupo de tratamento com ácido demonstrou um aumento notável na proliferação em comparação com o grupo de jateamento de areia ($p = 0,02$) e o grupo de controle, indicando um efeito favorável da gravação de ácido. A viabilidade celular aumentou

significativamente em ambos os grupos de 24 para 72 h. As comparações entre grupos em 72 h revelaram diferenças estatisticamente significativas, indicando variações na resposta celular entre as condições de tratamento.

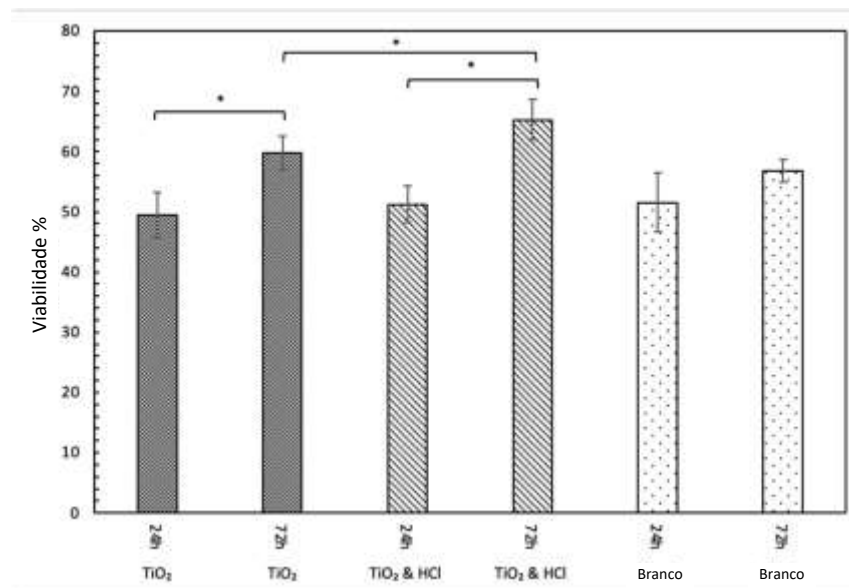


Figura 5. Viabilidade celular representada como % em cada grupo. Viabilidade celular (%) das células hFOB no jateamento de areia de TiO₂ e superfícies tratadas com HCl e TiO₂ às 24 h e 72 h. Um aumento significativo foi observado ao longo do tempo em ambos os grupos, com maior viabilidade no grupo tratado com ácido às 72 h ($p < 0,05$). *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

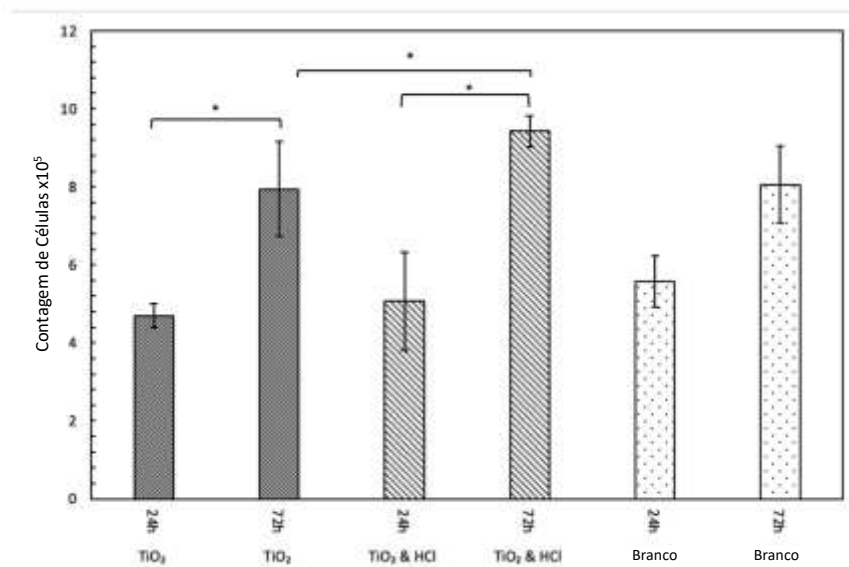


Figura 6. Proliferação de células hFOB em jateamento de areia de TiO₂ e superfícies de TiO₂ e HCl às 24 h e 72 h. Foi observado um aumento dependente do tempo, com o grupo TiO₂ e HCl exibindo proliferação significativamente aumentada em 72 h em comparação com o jateamento de areia de TiO₂ ($p < 0,05$). *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

3.2.2. Resultados da Citotoxicidade

A análise do MTT foi realizada às 24 e 72 h de cultura, revelando um aumento significativo na atividade metabólica celular dentro do grupo com ácido, do dia 1 ao dia 3. Além disso, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos no dia 3 ($p < 0,001$), sugerindo que a atividade metabólica pode servir como um indicador indireto

da taxa de proliferação celular, com a superfície tratada com ácido exibindo resposta celular superior em comparação com o grupo de jateamento de areia (Figura 7). Quando comparados ao Branco (controle), ambos os grupos tratados na superfície apresentaram menor atividade metabólica. O grupo de controle exibiu os valores mais altos de OD em ambos os momentos, mas com maior variabilidade, provavelmente refletindo a ausência de restrições de superfície e o potencial crescimento celular.

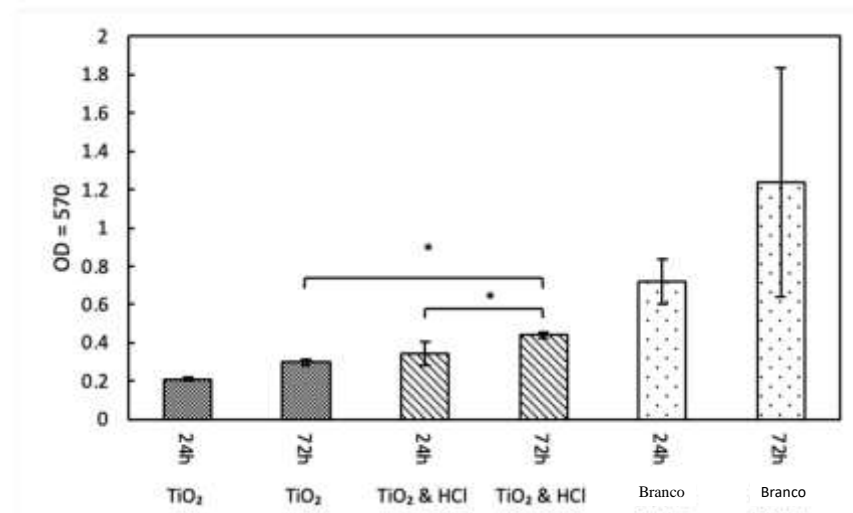


Figura 7. A atividade metabólica das células hFOB com diferentes tratamentos de superfície, diferenças significativas podem ser observadas no dia 3, favorecendo grupos aprimorados com ácido. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

3.2.3. Resultados da Morfologia Celular

A morfologia celular foi avaliada qualitativamente via SEM após 24 e 72 h de cultura. As imagens SEM de ambos os grupos mostraram que as células hFOB achatadas e alongadas aderiram às superfícies. Anexos de filopódios foram encontrados em todas as amostras; no entanto, esses anexos foram mais abundantes nos grupos gravados, especialmente após 72 horas de cultura. O jateamento de areia mostrou osteoblastos em forma de reticular às 24 h, enquanto às 72 h apresentaram hFOB em forma de fuso. As imagens SEM revelaram que os osteoblastos se espalham muito planos e se prendem firmemente às duas superfícies de jateamento de areia de TiO₂ e TiO₂ + HCl (Figura 8). As células do grupo Branco (sem material) exibiram ampla morfologia lamelar com menos direcionalidade e maior variabilidade, provavelmente devido à ausência de pistas topográficas da superfície.

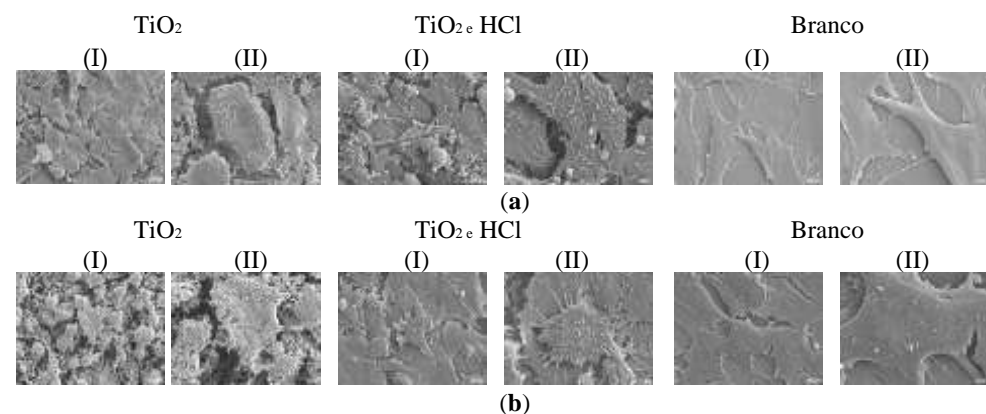


Figura 8. Morfologia de células SEM durante (a) 24 h e (b) 72 h, sob uma ampliação diferente (I) 1 K; (II) 3 K.

Ultimamente, a forma das células tem sido considerada uma propriedade emergente da interação sutil entre fenótipo celular e propriedades físicas. A intensidade da fluorescência e o número de células hFOB aumentaram de 24 para 72 h (Figura 9). Em geral, o osteoblasto apresentou morfologia circular; no entanto, a área de espalhamento celular aumentou ligeiramente com o tratamento com ácido e exibiu muitas extensões citoplasmáticas e filopodia. O grupo Branco apresentou células maiores e mais irregularmente distribuídas em ambos os momentos, com aumento da intensidade da fluorescência, mas menos orientação.

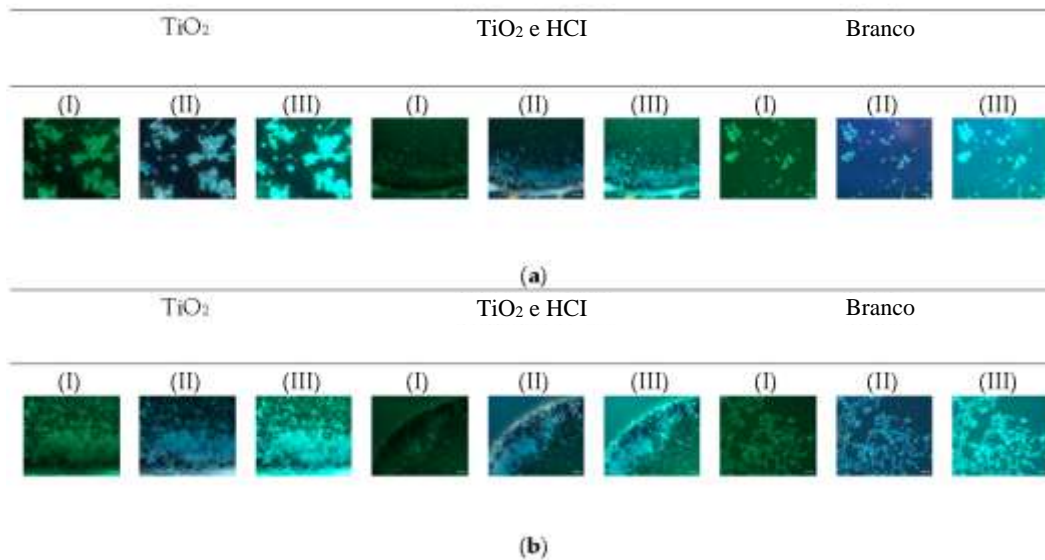


Figura 9. A adesão e o citoesqueleto hFOB foram avaliados nas superfícies após (a) 24 h e (b) 72 h, FITC; (II) DAPI; (III) mesclado.

4. Discussão

Este estudo apresenta um método de tratamento de superfície livre de contaminação para implantes de titânio usando jateamento de partículas de TiO_2 , seguido de gravação de HCl. Ao contrário da abordagem convencional do SLA que usa o jateamento de alumina, nosso método elimina o risco de partículas de alumínio incorporadas, uma preocupação cada vez mais aumentada na literatura recente de implantes [12,15]. Da mesma forma que outros estudos, observamos que jateamento com partículas de TiO_2 não deixa contaminação residual detectável nas superfícies do implante de titânio, resultando em uma superfície limpa. Além disso, nos referimos a esse método como uma “*alternativa mais limpa*” não apenas devido à sua capacidade de gerar superfícies livres de resíduos, mas também porque simplifica o processamento químico, evitando o uso de ácido sulfúrico, um reagente altamente corrosivo e perigoso usado nos protocolos de SLA de ácido duplo convencional. Esse processo simplificado reduz o risco químico e a carga ambiental, enquanto melhora a reprodutibilidade e a segurança durante a fabricação. Portanto, o termo “mais limpo” abrange a pureza da superfície e a higiene do processo.

Do ponto de vista da engenharia de superfície, o método Superiore alcança a micro-nano topografia hierárquica, combinando duas técnicas acessíveis e biocompatíveis. A análise da rugosidade da superfície via AFM e perfilometria de contato mostrou aumentos significativos na R_a e R_q nos grupos TiO_2 e HCl. A complexidade aprimorada da superfície fornece locais de ancoragem para adsorção inicial de proteínas, proporciona a adesão celular e suporta a diferenciação osteogênica. Esses parâmetros posicionam a superfície de TiO_2 e HCl dentro da faixa do que é considerado uma superfície rugosa média, uma categoria que tem sido amplamente demonstrada para provocar um comportamento biológico superior em termos de

adesão osteoblástica e contato ósseo-implante [26,27]. Resultados semelhantes nas métricas de rugosidade da superfície foram relatados em procedimentos de tratamento mais complexos, como a gravação de ácido duplo. Por exemplo, alguns autores demonstraram que as superfícies do tipo SLA tratadas com HCl/H₂SO₄ alcançaram valores de R_a na faixa de 1,5 a 2,0 µm e valores de R_q igualmente altos, colocando a superfície de TiO₂ e HCl dentro de um espectro topográfico comparável [28,29].

Os dados SEM morfológicos indicaram que a gravação de ácido pós-jateamento produziu lacunas mais profundas e limites mais definidos de grãos. Isso se alinha com relatórios indicando que a porosidade nano-escala induzida por ácido aumenta a energia da superfície e replica de perto as características estruturais do osso trabecular [19,30]. Embora o tratamento somente para HCl não tenha a dupla gravação agressiva de ácido do SLA, seu desempenho biológico in vivo permaneceu comparável, como também demonstrado por estudos que relatam resultados favoráveis de osseointegração em implantes tratados uma única vez com ácido em modelos pré-clínicos [22].

De fato, um dos resultados mais notáveis deste estudo é que o TiO₂ e o HCl promoveram a proliferação estatisticamente significativa dos osteoblastos e a maior atividade metabólica às 72 h quando comparada apenas ao jateamento de Ti, utilizando a linha celular dos osteoblastos humanos (hFOB). Esses resultados apoiam a hipótese de que superfícies gravadas uma única vez com ácido podem atingir respostas biológicas comparáveis às de superfícies com dupla gravação ácida, particularmente quando precedidas por técnicas efetivas de águas de superfície, como jateamento de areia.

Estudos comparativos apoiam essa observação, enfatizando que a adição de um segundo ácido em tratamentos duplos apenas aumenta marginalmente nano-topografia, mas não garante resultados biológicos superiores [30]. Estudos adicionais comparando vários tratamentos de superfície mostraram que provocam respostas osteoblásticas semelhantes, destacando que a presença de uma microestrutura áspera geralmente desempenha um papel mais crítico do que a agressividade química específica do protocolo de gravação [31].

Além disso, o uso de partículas de TiO₂ em vez de Al₂O₃ para jateamento oferece uma vantagem crucial de biocompatibilidade. As partículas de titânio, sendo quimicamente idênticas ao substrato do implante, não introduzem materiais estranhos que podem interferir nas respostas celulares. Vários estudos demonstraram que superfícies jateadas com TiO₂ apresentam química de superfície mais limpa e menor potencial inflamatório em comparação às superfícies jateadas com Al₂O₃. Esse perfil mais limpo pode melhorar a adesão e proliferação celular precoce, reduzindo a presença de contaminantes incorporados que podem prejudicar a adsorção de proteínas e as vias de sinalização da integrina [18].

Clinicamente, nossos resultados sugerem que a modificação da superfície de TiO₂ e HCl pode replicar o desempenho das superfícies do SLA, evitando seus obstáculos. As superfícies tradicionais do SLA, embora eficazes, requerem lidar com vários agentes corrosivos e podem resultar em contaminantes incorporados. Nosso método, por outro lado, usa uma abordagem de ácido único simplificado, eliminando a necessidade de ácido sulfúrico, o que não apenas reduz a carga química e o impacto ambiental, mas também facilita melhor reprodutibilidade e expansão industrial.

Do ponto de vista da fabricação, as partículas de TiO₂ são mais caras que o Al₂O₃, mas o custo total pode ser compensado eliminando o processamento do H₂SO₄, minimizando as etapas de limpeza e reduzindo a corrosão do equipamento. Isso torna o método TiO₂ e HCl não apenas mais seguro e limpo, mas também mais econômico a longo prazo.

Enquanto tratamentos com ácido duplo como HCl/H₂SO₄ podem melhorar a nano-rugosidade e a energia da superfície, seus benefícios biológicos parecem marginais quando a micro-rugosidade eficaz já é alcançada por jateamento, o que desempenha um papel mais decisivo na promoção do comportamento dos osteoblastos do que o número de ácidos utilizados [14,19,31].

Portanto, nossos resultados contribuem para um consenso crescente de que o efeito sinérgico do desbaste mecânico (via jateamento de areia) e a modificação química (através de um único ácido leve) são suficientes para desencadear respostas celulares robustas, sem os riscos associados a protocolos de ácido duplo.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser reconhecidas. Primeiro, os parâmetros do jateamento de areia foram otimizados com base em testes preliminares e dados da literatura, mas um estudo paramétrico mais abrangente pode fornecer informações mais profundas sobre sua influência na qualidade da superfície. Segundo, a análise das características da superfície foi limitada a técnicas selecionadas e métodos adicionais, como perfilometria 3D ou microscopia avançada, poderiam elucidar ainda mais a morfologia da superfície. Terceiro, não foi avaliado o desempenho a longo prazo das superfícies tratadas em condições ambientais reais, o que restringe a compreensão do comportamento de durabilidade e desgaste. Por fim, o estudo se concentrou em um protocolo de material e tratamento específico; portanto, os resultados podem não ser diretamente generalizados para outros materiais ou condições de jateamento sem investigação adicional.

5. Conclusões

Dentro das limitações deste estudo *in vitro*, concluímos que a modificação da superfície que combina o jateamento de partículas de TiO₂ com a gravação de HCl de etapa única representa uma superfície micro-nano sem resíduos e biocompatíveis para implantes de titânio. Esse tratamento gerou uma topografia hierárquica com aumento da rugosidade e promoveu a proliferação aprimorada de osteoblastos precoces, atividade metabólica e morfologia celular quando comparado apenas ao jateamento.

Além disso, essa abordagem pode ser considerada uma “alternativa mais limpa” aos tratamentos convencionais de SLA em dois aspectos principais: (1) resulta em uma superfície mais limpa quimicamente, livre de contaminantes incorporados, como partículas de alumina; e (2) simplifica o protocolo de tratamento de superfície usando apenas HCl em vez de gravação de ácido duplo (HCl/H₂SO₄), reduzindo assim os riscos de manuseio químico, impacto ambiental e complexidade industrial.

Assim, esse método oferece uma estratégia de modificação de superfície mais segura, reproduzível e potencialmente mais sustentável. No entanto, é necessária uma validação *in vivo* para confirmar a relevância clínica desses resultados.

Contribuições dos Autores: Conceitualização, A.S., S.A.G. e A.L.; metodologia, A.S., S.A.G. e J.E.; software, A.L.; validação, J.E.M.S.D.V. e C.P.-A.M.; análise formal, J.M.G.M. e J.E.; investigação, J.M.G.M. e A.L.; recursos, A.S. e S.A.G.; curadoria de dados, S.A.G.; escrita - preparação do projeto original, A.L.; escrita - revisão e edição, A.S. e S.A.G.; visualização, J.E.; supervisão, J.M.G.M. e J.E.; administração do projeto, J.E.M.S.D.V.; aquisição de financiamento, J.E.M.S.D.V. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Esta investigação não recebeu qualquer financiamento externo.

Declaração do Conselho de Revisão Institucional: Não aplicável.

Declaração de Consentimento Informado: Não aplicável.

Declaração de Disponibilidade de Dados: As contribuições originais apresentadas neste estudo estão incluídas no artigo. Outras investigações podem ser direcionadas aos autores correspondentes.

Conflitos de Interesse: Os autores declaram nenhum conflito de interesses.

Abreviações

As seguintes abreviações são usadas neste manuscrito:

AFM	Microscopia de força atômica
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SP	Perfilômetro de contato
hFOB	Osteoblastos humanos

Referências

- Kim, J.C.; Lee, M.; Yeo, I.L. Three interfaces of the dental implant system and their clinical effects on hard and soft tissues. *Mater. Horiz.* **2022**, *9*, 1387–1411. [[CrossRef](#)]
- Campos-Bijit, V.; Inostroza, N.C.; Orellana, R.; Rivera, A.; Von Marttens, A.; Cortez, C.; Covarrubias, C. Influence of Topography and Composition of Commercial Titanium Dental Implants on Cell Adhesion of Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells: An In Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 16686. [[CrossRef](#)]
- Souza, J.G.S.; Bertolini, M.M.; Costa, R.C.; Nagay, B.E.; Dongari-Bagtzoglou, A.; Barão, V.A.R. Targeting implant-associated infections: Titanium surface loaded with antimicrobial. *iScience* **2020**, *24*, 102008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Luo, J.; Walker, M.; Xiao, Y.; Donnelly, H.; Dalby, M.J.; Salmeron-Sanchez, M. The influence of nanotopography on cell behaviour through interactions with the extracellular matrix—A review. *Bioact. Mater.* **2021**, *15*, 145–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhang, Y.; Fan, Z.; Xing, Y.; Jia, S.; Mo, Z.; Gong, H. Effect of microtopography on osseointegration of implantable biomaterials and its modification strategies. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 981062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Majhy, B.; Priyadarshini, P.; Sen, A.K. Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth—facile surface modification for enhanced cell culture. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 15467–15476. [[CrossRef](#)]
- Yang, K.R.; Hong, M.H. Improved Biocompatibility and Osseointegration of Nanostructured Calcium-Incorporated Titanium Implant Surface Treatment (XPEED®). *Materials* **2024**, *17*, 2707. [[CrossRef](#)]
- Velasco-Ortega, E.; Ortiz-García, I.; Jiménez-Guerra, A.; Núñez-Márquez, E.; Moreno-Muñoz, J.; Rondón-Romero, J.L.; Cabanillas-Balsera, D.; Gil, J.; Muñoz-Guzón, F.; Monsalve-Guil, L. Osseointegration of Sandblasted and Acid-Etched Implant Surfaces. A Histological and Histomorphometric Study in the Rabbit. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8507. [[CrossRef](#)]
- Patel, R.; Patel, S.; Girgis, W.; Ahmed, W.; Barrak, F. A systematic assessment of the stability of SLA(R) vs. SLActive(R) implant surfaces over 12 weeks. *Evid. Based Dent.* **2025**, *26*, 67–68. [[CrossRef](#)]
- Wang, M.Y.; Ge, X.Y.; Zheng, Y.; Wang, C.X.; Zhang, Y.; Lin, Y. Microarray analysis reveals that lncRNA PWRN1-209 promotes human bone marrow mesenchymal stem cell osteogenic differentiation on microtopography titanium surface in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. B* **2020**, *108*, 2889–2902. [[CrossRef](#)]
- Vieira, G.M.; Almeida, T.C.S.; Oliveira, F.P.; Azzi, P.C.; Rodrigues, C.F.; Souza, R.L.; Lacerda, S.M.S.N.; Lages, F.S.; Martins, M.D. Comparative Study of Acid Etching and SLA Surface Modification for Titanium Implants. *Materials* **2025**, *18*, 1632. [[CrossRef](#)]
- Schupbach, P.; Glauser, R.; Bauer, S. Al₂O₃ Particles on Titanium Dental Implant Systems following Sandblasting and Acid-Etching Process. *Int. J. Biomater.* **2019**, *2019*, 6318429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dhaliwal, J.S.; David, S.R.N.; Zulhilmi, N.R.; Dhaliwal, S.K.S.; Knights, J.; De Albuquerque, R.F. Contamination of titanium dental implants: A narrative review. *SN Appl. Sci.* **2020**, *2*, 1011. [[CrossRef](#)]
- Velasco-Ortega, E.; Ortiz-García, I.; Jiménez-Guerra, A.; Monsalve-Guil, L.; Muñoz-Guzón, F.; Perez, R.A.; Gil, F.J. Comparison between Sandblasted Acid-Etched and Oxidized Titanium Dental Implants: In Vivo Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Panda, S.; Tumedei, M.; Panda, S.; Goker, F.; Depalma, C.M.; Pande, T.; Del Fabbro, M. The Biological Impact of Residual Aluminum Particles on Sand-Blasted Dental Implant Surfaces: A Systematic Review of Animal Studies. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 7745. [[CrossRef](#)]
- Aparicio, C.; Padros, A.; Gil, F.J. In vivo evaluation of micro-rough and bioactive titanium dental implants using histometry and pull-out tests. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2011**, *4*, 1672–1682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Deppe, H.; Wolff, C.; Bauer, F.; Ruthenberg, R.; Sculean, A.; Mucke, T. Dental implant surfaces after insertion in bone: An in vitro study in four commercial implant systems. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *22*, 1593–1600. [[CrossRef](#)]
- Gehrke, S.A.; Ramirez-Fernandez, M.P.; Marín, J.M.G.; Salles, M.B.; Del Fabbro, M.; Guirado, J.L.C. A comparative evaluation between aluminium and titanium dioxide microparticles for blasting the surface titanium dental implants: An experimental study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* **2018**, *29*, 802–807. [[CrossRef](#)]
- Giner, L.; Mercadé, M.; Torrent, S.; Punset, M.; Pérez, R.A.; Delgado, L.M.; Gil, F.J. Double acid etching treatment of dental implants for enhanced biological properties. *J. Appl. Biomater. Func. Mater.* **2018**, *16*, 83–89. [[CrossRef](#)]
- Wu, Y.F.; Wan, K.M.; Lu, J.H.; Yuan, C.Y.; Cui, Y.W.; Duan, R.Q.; Yu, J. Research Progress on Surface Modification of Titanium Implants. *Coatings* **2025**, *15*, 229. [[CrossRef](#)]
- Ossowska, A.; Zielinski, A. The Mechanisms of Degradation of Titanium Dental Implants. *Coatings* **2020**, *10*, 836. [[CrossRef](#)]
- Gehrke, S.A.; da Costa, E.M.; Junior, J.A.; Eilers Treichel, T.L.; Del Fabbro, M.; Scarano, A. Comparison Between Micro- and Micro-

- Nano Surface Texturization in the Initial Osseointegration Process: An Experimental In Vitro and In Vivo Preclinical Study. *Bioengineering* **2025**, *12*, 175. [[CrossRef](#)]
23. ASTM. *Annual Book of ASTM Standards. Volume Section 13: Medical Devices*; American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA, USA, 2024.
 24. Adhitya, K.; Mustika, T.; Manawan, M.; Ulfah, I.M.; Hanafi, R.; Setyadi, I.; Suryadi, Hidayat, A.; Wibisono, M.; Sah, J.; et al. Optimizing surface properties in pure titanium for dental implants: A crystallographic analysis of sandblasting and acid-etching techniques. *Powder Diffr.* **2024**, *39*, 206–216. [[CrossRef](#)]
 25. Mustafa, K.; Wennerberg, A.; Wroblewski, J.; Hultenby, K.; Lopez, B.S.; Arvidson, K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin. Oral Implant. Res.* **2001**, *12*, 515–525. [[CrossRef](#)]
 26. Le Guéhennec, L.; Soueidan, A.; Layrolle, P.; Amouriq, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.* **2007**, *23*, 844–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 27. Wennerberg, A.; Albrektsson, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. *Clin. Oral Implant. Res.* **2009**, *20* (Suppl. 4), 172–184. [[CrossRef](#)]
 28. Tavares, M.G.; De Oliveira, P.T.; Nanci, A.; Hawthorne, A.C.; Rosa, A.L.; Xavier, S.P. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with HSO/HO enhances contact osteogenesis. *Clin. Oral Implant. Res.* **2007**, *18*, 452–458. [[CrossRef](#)]
 29. Wennerberg, A.; Ide-Ektessabi, A.; Hatkamata, S.; Sawase, T.; Johansson, C.; Albrektsson, T.; Martinelli, A.; Södervall, U.; Odellius, H. Titanium release from implants prepared with different surface roughness: An and study. *Clin. Oral Implant. Res.* **2004**, *15*, 505–512. [[CrossRef](#)]
 30. Stich, T.; Alagboso, F.; Krennek, T.; Kovarik, T.; Alt, V.; Docheva, D. Implant-bone-interface: Reviewing the impact of titanium surface modifications on osteogenic processes in vitro and in vivo. *Bioeng. Transl. Med.* **2022**, *7*, e10239. [[CrossRef](#)]
 31. Bang, S.M.; Moon, H.J.; Kwon, Y.D.; Yoo, J.Y.; Pae, A.; Kwon, I.K. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin. Oral Implant. Res.* **2014**, *25*, 831–837. [[CrossRef](#)]

Aviso Legal/Nota do Editor: As declarações, opiniões e dados contidos em todas as publicações são da exclusiva responsabilidade do(s) autor(es) e colaborador(es) individual(is) e não da MDPI e/ou do(s) editor(es). A MDPI e/ou o(s) editor(es) se isentam de responsabilidade por quaisquer danos a pessoas ou propriedades resultantes de quaisquer ideias, métodos, instruções ou produtos mencionados no conteúdo.