Universidade de São Paulo
Instituto de Física

# Modificação Superficial de Titânio para Promoção de Osteointegração

Jim Heiji Aburaya

Orientador: Professor Doutor Manfredo Harri Tabacniks

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Área de Física Aplicada).

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Manfredo Harri Tabacniks (IF-USP)
Prof. Dr. José Fernando Diniz Chubaci (IF-USP)
Profa. Dra. Carmen Silvia de Moya Partiti (IF-USP)
Prof. Dr. André Luiz do Valle de Zoppa (FMVZ-USP)
Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli (FMVZ-USP)

São Paulo
2011

Este trabalho está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 09/09/09 conforme certificado no. 1749/2009.

## DEDICATÓRIA

Às Famílias: de ontem, de hoje e de amanhã.

Ao João, à Talita, ao Kenzo, ao Carlos, à Isabel, à Luísa, à Letícia e ao Samuel.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Manfredo Harri Tabacniks do Departamento de Física Aplicada do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pela orientação científica.

Ao Prof. Dr. Nemitala Added do Departamento de Física Nuclear e ao Grupo de Física Aplicada com Aceleradores do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pelo apoio.

À Carolina Nunes, pelo trabalho junto ao implantador iônico do Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Ariel Lenharo, ao Alexandre Oliveira, à Dra Esther Reiko Takamori e aos demais colaboradores ocultos da SIN – Sistema de Implante, pelo fornecimento das amostras de titânio e materiais de suporte à pesquisa.

Ao Jorge de Jesus Gomes Leandro e à Wanda Gabriel Pereira Engel do Laboratório de Alvos do Departamento de Física Nuclear do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pelas evaporações de filmes atômicos.

À Rita Tereza dos Santos do Laboratório de Química, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pela limpeza das amostras.

Ao Sr. Donato João Binelli, Pedro Manoel Joaquim e Marcos Santos de Souza da Oficina Mecânica Central do Instituto de Física da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Henrique Estanislau Maldonado Peres do Laboratório de Microeletrônica do Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, pela implantação iônica de flúor, boro e fósforo.

Ao Dr. Marcel Dupret Lopes Barbosa, ao Marcos Rodrigues Antônio, ao Renan Ferreira de Assis e ao Tiago Silva do Laboratório de Análise de Materiais por Feixes Iônicos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pela irradiação das superfícies das amostras.

À Profa. Dra. Catarina Abdalla Gomide da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, pelo apoio em minha estadia no campus de Pirassununga.

À Priscila Ribeiro dos Santos, pós-graduanda do Departamento de Física Experimental do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pela discussão e estabelecimento da cultura celular.

À Profa. Dra. Vanda Jorgetti e à Rita Martin do Laboratório de Nefropatologia do Departamento de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela cessão da linhagem celular.

Aos Médicos Veterinários Márcia Kazumi Nagamine e Daniel Soares Sanches, pós-graduandos, à Marguiti Izaura Soares da Silva e à Prof. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela cultura celular.

Ao Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo apoio no preparo das colorações para a contagem celular.

À Clara Satsuki Mori, à Marli Elizabete Ferreira de Castro e à Profa. Dra. Márcia Mery Kogika do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelas análises de atividade enzimática de fosfatase alcalina.

Ao Antônio Carlos Franco da Silveira e à Profa. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini do Laboratório de Cristalografia do Departamento de Física Aplicada do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pela difratometria de raios X.

Ao Vinicius Freire Elias e ao Prof. Dr. André Paulo Tschiptschin do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, pelas imagens de microscopia eletrônica.

À Profa. Dra. Carmen Silvia de Moya Partiti, à Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy e ao Prof. Dr. José Fernando Diniz Chubaci do Instituto de Física; ao Prof. Dr. Augusto Câmara Neiva da Escola Politécnica; à Profa. Maria Lúcia Zaidan Dagli e ao Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela qualificação deste trabalho.

À Cláudia Conde Barioni Gonçalves, à Francisleine Mendes Rezina, ao Éber De Patto Lima, à Marina Sundfeld Pereira, à Paula Cristina Rodrigues Mondini e à Profa. Dra. Carmen Pimentel Cintra do Prado da Comissão de Pós-Graduação do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pelo zeloso cuidado com os alunos.

Ao corpo docente do Instituto de Química, do Instituto de Oceanografia, do Instituto de Astrofísica e Geofísica, do Instituto de Matemática e Estatística, do Instituto de Biociências, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, pela formação acadêmica.

Aos demais funcionários e docentes da Universidade de São Paulo.

**Muito obrigado**

Jim Heiji Aburaya

**EPÍGRAFE**

大志を抱け

citado pela Profa. Rumi Yamamura

# RESUMO

ABURAYA, J.H. **Modificação Superficial de Titânio para Promoção de Osteointegração**. Tese de Doutorado. Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O titânio é considerado um biomaterial (material biocompatível) pela baixa reatividade e pela grande estabilidade da sua camada de óxido superficial. Pelas suas propriedades mecânicas ele é usualmente utilizado na fabricação de substitutos ósseos e implantes dentários. Visando contribuir para o desenvolvimento de novas superfícies osteointegráveis, neste trabalho foram estudadas duas superfícies de titânio modificadas com implantação iônica de P e $BF_2$ com energia de 30 e 77keV, respectivamente. As superfícies foram submetidas a ensaios *in vitro* de cultura celular de células osteoblásticas (MG-63) e os resultados foram comparados com duas superfícies comerciais: poliestireno tratado para meio de cultura celular (PC) e titânio comum utilizado em implante dentário (TI). A atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA) associadas à formação de biofilme mineralizado pelas células diferenciadas foram avaliadas. Concentrações de cálcio e fósforo no biofilme foram determinadas por espectroscopia de Raios-X induzida por prótons, PIXE. Imagens superficiais com microscopia eletrônica de varredura serviram para verificar a homogeneidade e integridade dos biofilmes formados. Medidas de ângulo de contato foram realizadas para determinar o caráter hidrofílico das superfícies e do biofilme formado. As superfícies PC e TI se apresentaram hidrofílicas com formação de biofilme menos homogêneo que as apresentadas pelas superfícies PT e BFT, ambas hidrofóbicas. As concentrações de FA medidas no meio de cultura indicaram consumo maior que a secreção em PC e TI. Em PT e BFT foram observados acúmulos de FA no meio de cultura. Concentrações maiores de cálcio e fósforo foram observadas em PC e TI. Destas observações, as quatro superfícies podem ser consideradas biocompatíveis (não citotóxicas) pela formação de biofilme mineralizado e pelas medidas de atividade enzimática.

Palavras chave: biomaterial metálico, titânio, íons, células em cultura

## ABSTRACT

ABURAYA, J.H. **Titanium Modification for the Promotion of Osteointegration**. PhD Thesis. Institute of Physics, University of São Paulo, São Paulo, 2011.

Titanium is considered a biomaterial (biocompatible material) due to its low reactivity and the great stability of its surface native oxide layer. With excellent mechanical properties, titanium is widely used as bone substitutes and dental implants. Aiming to contribute for the development of new surfaces to promote osteoblastic cell grow, two ion-beam-modified titanium samples were compared with two commercially available surfaces: polystyrene treated for cellular cultures (PC), and regular titanium used in dental implants (TI). The modified titanium samples were ion beam implanted with 30 and 77 keV phosphorous and $BF_2$, respectively. All surfaces were employed for *in vitro* assays using cultures of osteoblastic cells (MG-63). The Phosphatase Alkaline Enzymatic Activity (ALP) was measured and associated with the mineralized bio-film formed by the differentiated cells. The concentration of calcium and phosphorus in the mineralized bio-film was measured by Proton Induced X-ray Emission, PIXE. Scanning Electron Microscope images were used to access the bio-film homogeneity and integrity. Contact angle measurements were used to characterize the wettability of the surfaces and the resulting bio-film. In spite of being more hydrophilic, the surfaces PC and TI formed of a less homogeneous bio-film than the PT and BFT surfaces, which were less hydrophilic. The ALP in the cell culture medium indicated greater consumption than secretion for PC and TI, while for PT and BFT accumulation of ALP was observed. Concentrations of calcium and phosphorus were greater for PC and TI samples. The four surfaces can be considered biocompatible (not cytotoxic) due to mineral bio-film formation and enzymatic activity measurements.



Keywords: biomaterial, titanium, ion implantation, cell culture

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da superfície oxidada de titânio puro. Adaptado de Brunette, 2001. ..... 21

Figura 2: Célula unitária das formas de $TiO_2$, encontradas em temperatura ambiente e pressão atmosférica. a. rutilo; b. anatase. Em branco, cátions de titânio. Em cinza, ânios de oxigênio. Retirado de Brunette, 2001. ..... 21

Figura 3: Eletromicrografia das superfícies de titânio atacadas quimicamente. ..... 23

Figura 4: Medidas de AFM das superfícies de titânio atacadas quimicamente. Imagens de Tabacniks (2005). ..... 24

Figura 5: Esquema da cascata de colisões que ocorrem na implantação iônica. Adaptado de Nastasi, 2008. ..... 27

Figura 6: Esquema de uma gota, em equilíbrio térmico com uma superfície sólida horizontal, num ambiente saturado de vapor, e a representação das tensões superficiais. ..... 29

Figura 7: Da esquerda para a direita: células em suspensão, células aderidas à superfície (24h) e células conduzidas à confluência (10d). Linhagem MG-63 (ATCC). 10X. ..... 32

Figura 8: Esquema de um microscópio eletrônico de varredura. ..... 38

Figura 9: Da esquerda para a direita: Placa de cultura Corning® TCT (retirado do Catálogo Corning®, 2011), discos de titânio, discos de titânio já esterilizado. ..... 41

Figura 10: Perfis das implantações avaliadas por simulação computadorizada (SRIM, 2008). A imagem superior corresponde à implantação de fósforo 30 keV; inferior à esquerda, a implantação de flúor 30 keV; à direita, a implantação de boro 17 keV. ..... 43

Figura 11: Micropipetador automatizado desenvolvido para observação dos ângulos de contato: (a) micropipetador; (b) resistência de aquecimento; (c) porta-amostras; (d) ponteira plástica; (e) câmera digital; (f) nível de bolha; (g) mesa maciça em aço; (h) disparador. No alto a direita, detalhe do porta-amostra e ponteira para micropipetação (distância constante), Em baixo a direita, detalhe da gota obtida (volume de 10 μL). ..... 45

Figura 12: Determinação do ângulo de contato a partir da ferramenta *circle 3-point* do AutoCAD®. Os três pontos são determinados: dois deles nos pontos entre o limite da gota e a linha base da superfície; outro, tangente a superfície na margem superior. Ângulo entre a linha base e a tangente no ponto na interface ar-sólido-líquido é o ângulo de contato. ..... 46

Figura 13: Determinação do ângulo de contato a partir da ferramenta *elipse axis, end* do AutoCAD®. O eixo é determinado pelo segmento de reta que liga retas verticais tangentes as margens da gota; o último ponto é tangente a superfície na margem superior. Ângulo entre a linha base e a tangente no ponto na interface ar-sólido-líquido é o ângulo de contato. ..... 46

Figura 14: Placa de cultura com 24 poços, condicionando os discos de titânio para cultura da linhagem MG-63. ..... 50

Figura 15: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies da placa de cultura. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina. O valor de 57º para a água está de acordo com o apresentado no catálogo do fabricante (ao centro). Retirado de Corning® (2010). ..... 55

Figura 16: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies da placa de cultura sobre o biofilme produzido pela cultura celular. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina. ..... 56

Figura 17: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies de TiO2 não modificadas. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina. ..... 57

Figura 18: A imagem superior à esquerda corresponde à eletromicrografia de elétrons retroespalhados da superfície TI. Regiões claras provêm da superfície do metal, regiões escuras, da matriz mineral formada; à direita, observação em olho desarmado de cultura sobre PC. Coloração por vermelho de alizarina. Retirado de Santos (2008); inferior à direita, eletromicrografia de elétrons secundários da superfície TI. As fissuras apresentadas são artefatos da fixação da cultura sobre a superfície. ..... 58

Figura 19: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies de TiO2 modificadas por implantação de fósforo. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina. ..... 59

Figura 20: A imagem superior corresponde à eletromicrografia de elétrons retroespalhados da superfície PT. Regiões claras provêm da superfície do metal, regiões escuras, da matriz mineral formada. A inferior, eletromicrografia de elétrons secundários da superfície PT. As fissuras apresentadas são artefatos da fixação da cultura sobre a superfície. ..... 60

Figura 21: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies de TiO2 modificadas por implantação de flúor e boro. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina. ... 61

Figura 22: A imagem superior corresponde à eletromicrografia de elétrons retroespalhados da superfície BFT. Regiões claras provêm da superfície do metal, regiões escuras, da matriz mineral formada. A inferior, eletromicrografia de elétrons secundários da superfície BFT. As fissuras apresentadas são artefatos da fixação da cultura sobre a superfície. ..... 63

Figura 23: Exemplo de variações observadas na cultura em função do tempo. Atividade de FA e fósforo seguiram o mesmo comportamento na placa de cultura. Linhas interrompidas ilustrativas ..... 65

Figura 24: O gráfico superior corresponde à relação de quantidade de cálcio e atividade de FA. O inferior, a relação entre a razão em massa, entre a quantidade de cálcio e a quantidade de fósforo, e atividade de FA. ..... 66

Figura 25: O gráfico superior corresponde à relação do ângulo de contato com água e atividade de FA. O inferior, a relação do ângulo de contato com glicerina e atividade de FA. Ângulos obtidos na superfície das amostras antes da cultura celular. ..... 68

Figura 26: Relação entre a concentração de fósforo no biofilme e o ângulo de contato para a água. ..... 69

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Algumas aplicações de materiais sintéticos em Medicina. ..... 16
Quadro 2: Etapas da cultura celular pós semeadura de células. ..... 33
Quadro 3: Classificação qualitativa das observações e indicações de atividade de mineralização; e de atividade de FA..... 66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Energia livre de Gibbs para formação de óxidos estáveis da reação com $O_2$ para o titânio e alumínio. ..... 20

Tabela 2: Níveis máximos aceitáveis nas diferentes classes de titânio comercial. Porcentagem em massa. ..... 22

Tabela 3: Valores de tensão superficial ($\boldsymbol{\gamma vl}$), energias livres de coesão dispersivas ($\gamma vld$), não dispersivas ($\gamma vlnd$) e componentes da interação ácido-base ($\gamma vl\ +$ e $\gamma vl\ -$) para alguns líquidos. Unidades em $mJ/m^2$. ..... 30

Tabela 4: Valores apresentados pela simulação computadorizada (SRIM, 2008) das taxas de erosão atômica (*sputtering*) devido às implantações iônicas realizadas **Ys**; indicativo de erosão preferencial $\mathbf{Ys(Ti)/Ys(O)}$; relação entre a quantidade de íons implantados e quantidade de moléculas do substrato $\mathbf{II/[TiO2]}$ na superfície. ..... 43

Tabela 5: Valores consolidados referentes aos obtidos na cultura celular nas quatro superfícies estudadas. ..... 63

Tabela 6: Valores consolidados referentes aos obtidos na análise do ângulo de contato nas quatro superfícies estudadas. ..... 64

**SUMÁRIO**

**INTRODUÇÃO** ..... **15**

**Biomateriais** ..... **15**

**Mercado de Biomateriais** ..... **17**

**Convênio SIN/USP** ..... **18**

**O Titânio** ..... **19**

**Implantação Iônica** ..... **24**

**Ângulo de Contato** ..... **28**

**Ensaio *in vitro*** ..... **31**

Cultura Celular ..... 31

Atividade na Diferenciação Celular ..... 33

Mineralização ..... 34

*PIXE* ..... *35*

Microscopia Eletrônica de Varredura ..... 37

**Correlações** ..... **39**

**OBJETIVOS** ..... **40**

**MATERIAIS E MÉTODOS** ..... **41**

**Amostras** ..... **41**

**Implantação Iônica** ..... **41**

Por que $BF_2$ e P? ..... 42

Por que a dose e a energia escolhidas? ..... 42

**Análise do Ângulo de Contato** ..... **44**

**Cultura Celular** ..... **46**

**Determinação de FA** ..... **51**

**Determinação das Concentrações Cálcio e Fósforo** ..... **52**

**Imagens de Microscopia Eletrônica** ..... **53**

**RESULTADOS E ANÁLISE.....55**

**Superfície da Placa de Cultura.....55**

**Superfície Comercial de Titânio.....56**

**Superfície Modificada por Implantação de Fósforo.....59**

**Superfície Modificada por Implantação de Flúor e Boro.....61**

**Atividade Celular versus Mineralização.....63**

**DISCUSSÃO.....70**

**CONCLUSÕES.....74**

**RECOMENDAÇÕES.....75**

**BIBLIOGRAFIA.....77**

**ANEXO – DESCRIÇÃO DO PRODUTO – CULTURA DE CÉLULAS MG-63.....84**

# INTRODUÇÃO

O objeto de investigação deste trabalho foi um biomaterial metálico, especificamente titânio puro, comumente utilizado em próteses dentárias intra-ósseas (implantes dentários), que foi modificado por implantação iônica e submetido a ensaio *in vitro* para verificar alterações em suas propriedades, especialmente a biocompatibilidade.

## Biomateriais

Biomateriais são definidos como materiais, sintéticos ou naturais, utilizados em várias aplicações na medicina para substituição funcional ou morfológica de sistemas biológicos, como tecidos e órgãos, com caráter temporário ou permanentemente, vital ou estético; e em aplicações terapêuticas e diagnósticas. De caráter temporal, por exemplo, fios de sutura de pele são mantidos por períodos curtos de tempo (dias a semanas); estabilizadores metálicos de fraturas por períodos intermediários (semanas a meses); e válvulas cardíacas por longos períodos (meses a anos). De caráter vital, o coração artificial e a circulação extracorpórea (temporariamente) substituem as funções cardíacas essenciais à manutenção da vida; esteticamente, próteses mamárias são utilizadas em tratamentos pós-mastectomia. De caráter terapêutico, podem ser citadas as membranas de máquinas de diálise, cateteres urinários e próteses ortopédicas, diretamente em contato com tecidos biológicos; e diagnóstica, por exemplo, nas soluções de contraste radiográfico (Dee, 2002).

A ciência dos biomateriais envolve normalmente pesquisadores com formação multidisciplinar ligados à Medicina, Biologia, Química e Ciência dos materiais, envolvendo estudos físicos e biológicos da interação entre os materiais e o ambiente biológico. A investigação científica se dá desde a síntese do material, passando pela sua caracterização, o estudo biológico da interação em ensaios *in vitro* e *in vivo*, à otimização. Estes ensaios são necessários para se determinar os processos fisiopatológicos (danos) da interação entre a superfície do material com determinados ambientes biológicos. Estes ambientes são determinados pelo tipo do tecido interagente, já que cada linhagem celular interage química e fisicamente, de maneira específica, com a superfície dos diferentes materiais, bem como os produtos de degradação do material com o seu metabolismo. O resultado é a avaliação do reparo funcional do tecido biológico, e se atende às necessidades específicas teciduais ou a bioatividade específica requerida

do material. No Quadro 1, tipos de materiais específicos com sua aplicação relacionada a alguns sistemas biológicos.

Quadro 1: Algumas aplicações de materiais sintéticos em Medicina.

| Aplicação | Tipo de Material |
|---|---|
| ***Sistema Esquelético*** | |
| Substituição de articulações | Titânio, Ti-Al-V, aço inox |
| Fixação de Fratura | Aço inox, Co-Cr |
| Reparação de defeito ósseo | Hidroxiapatita |
| Substituição de tendões e ligamentos | Teflon |
| Fixação de implantes dentários | Titânio, Ti-Al-V |
| ***Sistema Cardiovascular*** | |
| Substituição de vasos sanguíneos | Teflon, poliuretano |
| Substituição de válvulas cardíacas | Aço inox |
| Utilização de cateteres | Borracha de silicone, Teflon, poliuretano |
| ***Órgãos artificiais*** | |
| Coração | Poliuretano |
| Pele | Compósito de colágeno-silicone |
| Rins | Celulose, poliacrilonitrila |
| Córnea | Colágeno, hidrogel |

Fonte: Adaptado de Ratner et al. (2004).

Como exemplo de material que possui uma resposta nula do tecido biológico onde interage, o Teflon®, utilizado no revestimento interno de cateteres endovenosos, caracteriza uma bioatividade específica nula, com ausência, neste caso, de interação entre a superfície do material e os componentes do sangue, que mantém uma resposta química adequada, de não ativação da cascata de coagulação, e ausência de uma resposta física de agregação plaquetária. Contudo, a maioria dos materiais produz uma resposta biológica negativa, na qual as interações de superfície do material com as células determinam respostas celulares que desencadeiam reações inflamatórias e comprometimento da viabilidade celular (citotoxicidade). O entendimento da compatibilidade do material com sistemas biológicos (biocompatibilidade) dá-se pela habilidade de alguns materiais em induzir repostas biológicas adequadas a uma especí-

fica aplicação, em aumentar a velocidade de reparação, nos casos de substituição do tecido danificado, ou em iniciar a regeneração tecidual.

Nota-se que as características físicas e químicas da interação entre o biomaterial e o sítio de utilização determinam a composição e forma das próteses. A utilização de metais e suas ligas estão associadas a substituir tecidos onde há carga mecânica considerável (osso, dentes) devido as suas propriedades mecânicas. Materiais poliméricos são empregados onde, ou a aplicação necessita de flexibilidade (vasos sanguíneos, pele), ou que na síntese destes (fase de polimerização) permita obter forma e função adequada à aplicação (câmara cardíaca). Alguns tecidos são marcadamente especiais, como a pele e compósitos são utilizados para garantir características que agreguem resposta biológica e proteção física, como o caso da associação de colágeno e silicone. Alguns biomateriais são utilizados, ainda, pelas suas propriedades ópticas, por exemplo, na substituição da córnea ou o cristalino nos traumas oftálmicos, permitindo a passagem da luz à retina (Ratner, 2004).

**Mercado de Biomateriais**

O mercado em torno da utilização de biomateriais, globalmente, gira em torno de 25 bilhões de dólares anuais, envolvendo materiais utilizados na prática médica, ambulatorial e hospitalar; e materiais utilizados como substitutos biológicos. Só nos Estados Unidos, biomateriais utilizados em ortopedia correspondem à movimentação de 3,5 bilhões de dólares anuais, com crescimento esperado da ordem de 10% nos próximos cinco anos[1]. Esta expectativa se dá pela crescente parcela da população de idosos, que consome biomateriais na forma de próteses ortopédicas e dentárias nos tratamentos associados às doenças degenerativas do envelhecimento. Entre os segmentos ortopédicos em crescimento estão os substitutos ósseos, os substitutos ligamentares, as reparações de cartilagens e os fixadores ósseos absorvíveis. A menos dos substitutos ósseos, a nova geração de biomateriais concentram-se na tecnologia de polímeros.

No Brasil, as intervenções cirúrgicas ortopédicas envolvem um quarto do mercado de biomateriais, superado apenas pelas intervenções cardiovasculares, principalmente através da grande utilização de próteses endovasculares (*stents*) e válvulas cardíacas (Soares, 2005). Na Odontologia, aproximadamente 90 mil próteses dentárias anuais são comercializadas, com

[1] U.S. Market for Orthopedic Biomaterials 2011 - Executive Summary.

uma movimentação de aproximadamente 120 milhões de reais anuais, com o consumo de cerca de 70 mil implantes intra-ósseos por ano. O mercado é fortemente concentrado nas regiões Sul e Sudeste, equivalente a 70% do mercado nacional. Cinco empresas nacionais possuem 70% do mercado: sediada em Curitiba, a empresa Neodent; em São Paulo, as empresas Conexão, Bicom Sistema de Implantes e SIN Sistema de Implante, esta com linha de produtos também para Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial; no interior paulista, em São José dos Campos, a empresa Titanium Fix, maior exportadora de implantes dentários (Almeida, 2010).

**Convênio SIN/USP**

Em 2006, a empresa SIN Sistema de Implante (SIN) propôs o desenvolvimento de superfície de titânio biocompatível tratado com íons energéticos através de implantação iônica para o recém criado Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP). A SIN e a USP celebraram convênio de cooperação científico-tecnológico, onde a empresa seria responsável pelo fornecimento de amostras de titânio, em forma de discos, tratadas em banho ácido, conforme protocolo comercial da SIN; caracterização inicial das amostras; montagem do Implantador Iônico, recém transferido do *Hahn Meitner Institut* de Berlim, originalmente utilizado pelo grupo do Dr. Jochen Peter Biersack; caracterização das amostras modificadas; ensaios *in vitro* e *in vivo*.

O convênio ainda pactuava sobre propriedade intelectual dos inventos e possíveis aperfeiçoamentos e inovações. O resultado dos trabalhos do convênio culminou na patente INPI PI 0602522-6 “Processo para Biocompatibilidade do Titânio através de Implantação Iônica”, onde o autor deste trabalho é co-inventor (Processo RUSP 2007.1.12544.1.7). Dentre algumas atividades não relacionadas no convênio, implantes dentários tiveram suas superfícies modificadas por implantação iônica para testes *in vivo* e avaliação de carga mecânica das próteses experimentais, através de pesquisa interna da empresa. Parte das atividades celebradas no convênio motivou este trabalho, que utilizou amostras de titânio tratadas por processo químico e modificadas por implantação iônica como biomateriais candidatos a osteointegração (integração ao tecido ósseo).

**O Titânio**

O titânio foi descoberto no final do século XIX, pelo inglês William Gregor e pelo húngaro Klaproth. Seu nome associa-se aos primeiros filhos da terra, os titãs, da mitologia grega. Apresenta-se na concentração avaliada de 0,6 % dos constituintes da crosta terrestre, sendo naturalmente encontrada na sua forma oxidada, associado ao ferro, chamada ilmenita ($FeOTiO_2$). Ocorrem ainda na forma de rutilo ($TiO_2$), com pureza da ordem de 98%. No mundo, as maiores reservas se encontram na Austrália e Noruega com 25% das reservas mundiais. O Brasil possui 1% do globo, na qual dois terços da extração ocorrem no estado da Paraíba. O processo de redução ocorre a partir da conversão do óxido de titânio ($TiO_2$) em tetracloreto de titânio ($TiCl_4$):

$$TiO_2 \text{ (sólido)} + 4HCl \text{ (líquido)} \rightarrow 2H_2O + TiCl_4 \text{ (gás)}$$

e posteriormente a reação com magnésio líquido a cerca de 800ºC em vasos de aço inox herméticos (processo Kroll):

$$TiCl_4 \text{ (gás)} + 2Mg \text{ (líquido)} \rightarrow Ti \text{ (sólido)} + 2MgCl_2 \text{ (líquido)}$$

ou através da reação com sódio, em duas etapas ocorrendo a 300ºC a primeira redução:

$$TiCl_4 \text{ (gás)} + 2Na \text{ (líquido)} \rightarrow TiCl_2 \text{ (gás)} + 2NaCl \text{ (líquido)}$$

e a segunda redução, ocorrendo a cerca de 1000ºC:

$$TiCl_2 \text{ (gás)} + 2Na \text{ (líquido)} \rightarrow Ti \text{ (sólido)} + 2NaCl \text{ (líquido)}$$

A fundição em moldes é possível apenas com a utilização de aglutinantes não reagentes em moldes de grafita. Explica-se essa necessidade pela alta reatividade do titânio com a maioria dos elementos químicos. Possui dois elétrons na última camada $4s^2$, ocorrendo hibridação com os dois elétrons da camada $3d^2$. Assim as duas formas $Ti^{+2}$ e $Ti^{+4}$ são observadas. Exposto ao ar, oxida-se espontaneamente em $TiO_2$. Esta característica é responsável pelas propriedades de passividade eletroquímica. Inicialmente utilizada na década de 1950 na indústria aeroespacial, pela alta resistência mecânica e baixa densidade (4,54 $g/cm^3$, 60 % da densidade do ferro), é a passividade química (resistência a corrosão) que tem levado à sua utilização na Medicina e na Odontologia, em próteses e implantes intra-ósseos, já que os primeiros eventos após a colocação do implante intra-ósseo são as interações químicas com flui-

dos corpóreos, como sangue e o meio fisiológico tecidual. A utilização do titânio como implantes data do final da década de 60 (Branemark, 1969). As propriedades mecânicas estão próximas do tecido ósseo substituído (Hanawa, 1999).

Inicialmente considerado como material bioinerte (bioatividade nula), ou ainda biopassivo, a camada passivante de $TiO_2$ não é completamente inerte. A exposição aos fluidos corpóreos assemelha-se à exposição à água do mar, em termos de concentração de cloretos. Características na espessura, na composição e na microestrutura são alteradas nestes ambientes. Contudo, a espontaneidade da formação do óxido, permite que reparos nesta camada sejam realizados rapidamente e a separação entre os constituintes biológicos e o titânio reagente seja restabelecida apropriadamente (Liu, 2004). As reações espontâneas podem ser medidas através da energia livre da reação. Na Tabela 1, valores para a formação dos óxidos de titânio e para a formação de óxido de alumínio (reconhecido material passivo à corrosão) estão apresentados, a título de comparação. Valores negativos indicam reações espontâneas.

Tabela 1: Energia livre de Gibbs para formação de óxidos estáveis da reação com $O_2$ para o titânio e alumínio.

| **Metal** | **Óxido Estável** | **$\Delta G_0$ por mol de óxido formado [kJ/mol]** | **$\Delta G_0$ por mol de metal [kJ/mol]** |
|---|---|---|---|
| Titânio | $TiO_2$ | -888,8 | -888,8 |
| Alumínio | $Al_2O_3$ | -1582,3 | -791,15 |

Fonte: Brunette, 2001.

Frente às considerações de interatividade da superfície com o meio biológico, ainda se destacam a baixa solubilidade e a ausência de citotoxicidade do óxido de titânio. O ponto isoelétrico situa-se em pH 5-6, ou seja, no ambiente de pH fisiológico, a superfície mantém-se carregada negativamente, apresentando na superfície radicais $O^{2-}$ e $OH^-$. A constante dielétrica do filme de óxido de titânio (85,0 a 25ºC), comparável ao da água (78,4 a 25ºC), permite que interações coulombianas de moléculas carregadas sejam similares ao meio fisiológico. Ainda, é conhecido que tecido ósseo possui propriedades piezoelétricas, onde deformações mecânicas produzem potenciais elétricos que estão associados à remodelação óssea (Fukuda e Yasuda, 1957). Assim, minimizam-se a perturbação que o implante provoca nos potenciais e correntes elétricas gerados. Esquematicamente, a superfície oxidada do titânio puro pode ser

vista na Figura 1. Note as interações favoráveis com moléculas de água, com radicais aniônicos (hidroxila) e contaminações.

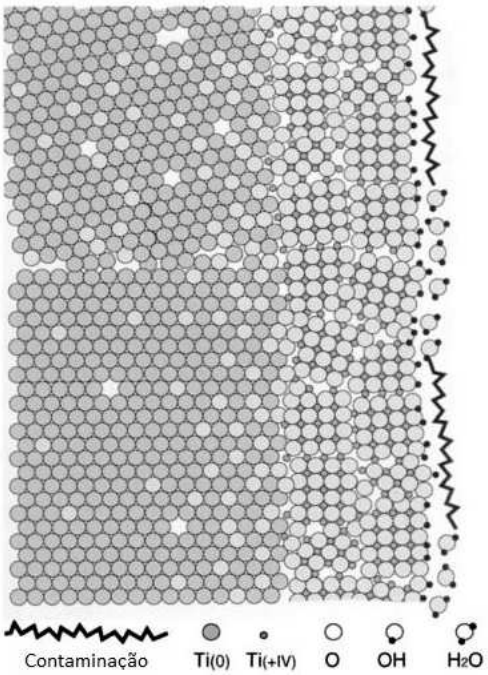



Figura 1: Esquema da superfície oxidada de titânio puro. Adaptado de Brunette, 2001.

O óxido de titânio ocorre em três formas cristalográficas: rutilo e anatase com estrutura tetragonal; e brookite com estrutura ortorrômbica. Na temperatura ambiente e pressão atmosférica, o óxido estável formado é a anatase. Em altas temperaturas, o rutilo prevalece como estrutura mais estável. A transformação anatase → rutilo é irreversível (Murray, 1987). Cada átomo de titânio coordena seis ânions oxigênios na rede cristalina sendo considerado um semicondutor tipo *n* não estequiométrico. A Figura 2 ilustra as formas cristalográficas da célula unitária do rutilo e anatase.

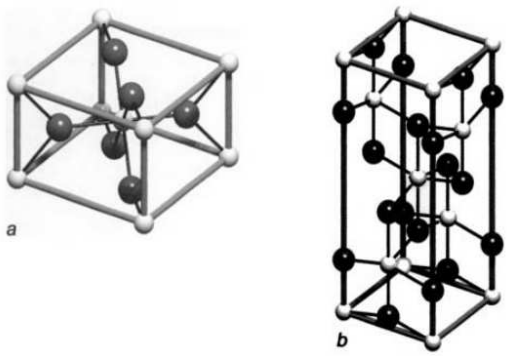



Figura 2: Célula unitária das formas de $TiO_2$, encontradas em temperatura ambiente e pressão atmosférica. a. rutilo; b. anatase. Em branco, cátions de titânio. Em cinza, ânios de oxigênio. Retirado de Brunette, 2001.

No processo de fundição, a camada superficial de óxido é de rutilo, formado devido as altas temperaturas envolvidas. Na usinagem no titânio para a fabricação de implantes, em temperaturas inferiores à transformação de fase, há o favorecimento da formação de anatase na superfície do titânio. Contudo, impurezas e produtos de reações com constituintes dos fluidos utilizados no resfriamento do metal na usinagem são indesejáveis. O procedimento para remover graxas e óleos é utilizar solventes orgânicos. Banhos em ácidos fortes são utilizados para remover a camada de óxido formada na usinagem, de tal forma que haja controle na formação da camada de óxido, quanto a sua homogeneidade e impurezas (Cochran, 2002; Rupp, 2004). O titânio utilizado nos implantes segue normas internacionais (ASTM F-67[2]). A Tabela 2 contém níveis de qualidade definidas na norma para diferentes classes de titânio comercializadas. As amostras deste trabalho segue especificação da Classe 2.

Tabela 2: Níveis máximos aceitáveis nas diferentes classes de titânio comercial. Porcentagem em massa.

| **Níveis máximos** | **Classe 1** | **Classe 2** | **Classe 3** | **Classe 4** |
|---|---|---|---|---|
| N | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,05 |
| C | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| H | 0,0125 | 0,0125 | 0,0125 | 0,0125 |
| Fe | 0,20 | 0,30 | 0,30 | 0,50 |
| O | 0,18 | 0,25 | 0,35 | 0,40 |

Fonte: ASTM F-67, 1995.

Topograficamente, o ataque ácido realizado em duas etapas, pela SIN, cria rugosidade bastante evidente (Figura 3), observada no microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Feng, 2003; Shalabi, 2006). Detalhes deste ataque, tipos e molaridade dos ácidos; e tempos envolvidos não estão descritos neste trabalho por se tratar de superfícies comerciais. O fenômeno que ocorre é conhecido como corrosão por pites. Caracteriza-se por uma corrosão localizada, com materiais sendo retirados em áreas mais vulneráveis, associadas à formação de cavidades em metais passivados expostos a agressivos ânions, em particular cloretos (Szklarska-Smialowska, 1986).

[2] American Society for Testing and Materials

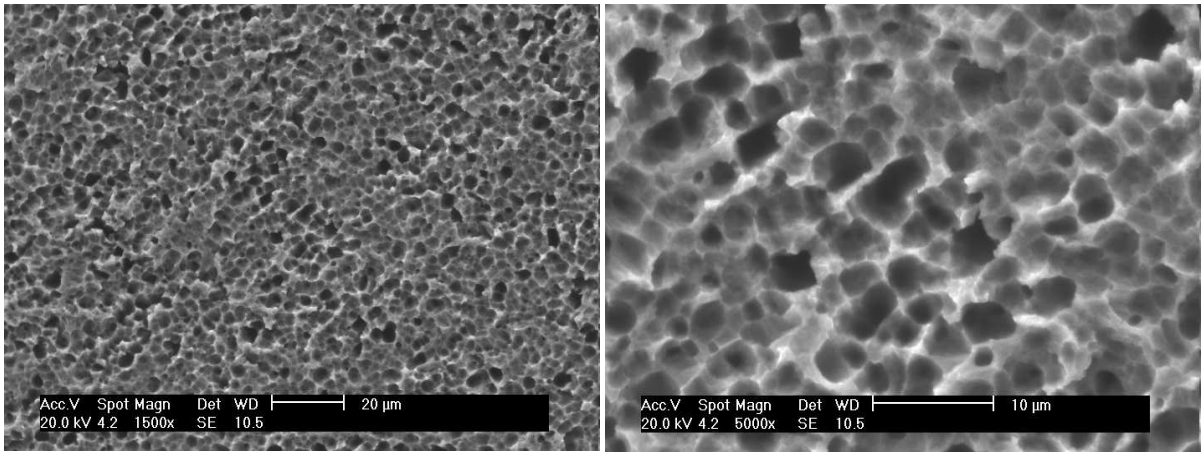



Figura 3: Eletromicrografia das superfícies de titânio atacadas quimicamente.

A corrosão inicia-se quando o limite de potenciais elétricos críticos na superfície é alcançado. Há então um centro iniciador (núcleo) da corrosão que percorre o domínio cristalino formado na metalurgia do metal. Estes domínios cristalinos são chamados de grãos e possuem diferentes orientações cristalográficas. A descontinuidade das propriedades elétricas, cristalográficas e composicionais, na superfície deste grão (defeitos de superfície – contorno de grão), estabelece as dimensões das cavidades observadas. Esses limites são definidos no momento do resfriamento, onde vários centros de solidificação arranjam-se em orientações cristalográficas estocásticas. Ainda na fase líquida, impurezas são expulsas para a periferia do grão, sendo responsáveis pela descontinuidade composicional da superfície. Medidas de AFM (*Atomic Force Microscope*) mostram uma elevação máxima de 2,7 µm, e rugosidade rms (*root mean square*) de 0,5 µm (Figura 4).

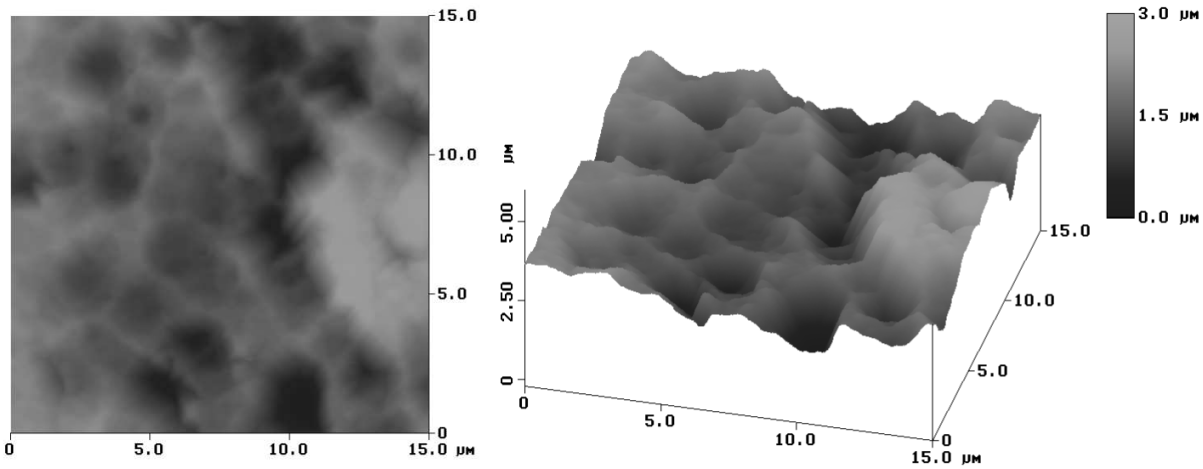


Figura 4: Medidas de AFM das superfícies de titânio atacadas quimicamente. Imagens de Tabacniks (2005)[3].

Melhorar as características da superfície passiva do titânio é um dos desafios para a ciência dos biomateriais. Por si só, o óxido de titânio é biocompatível. Contudo, em certos casos, é desejável uma resposta positiva do tecido biológico. Entre as técnicas de modificação da superfície, a anodização eletroquímica tem sido utilizada para alterar a rugosidade e a espessura do óxido superficial (Yang, 2004; Zhu, 2005; Besteti, 2007), sem nenhum resultado conclusivo. Outros tratamentos que não modificam a superfície, mas incluem novos componentes na tentativa de acrescentar repostas de biocompatibilidade mais adequadas podem ser citados: o PVD (*Physical Vapor Deposition*) com deposição física de vapor de cálcio (Hacking, 2007); cobertura superficial por cristais de hidroxiapatita ($CA_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), principal mineral da composição da matriz inorgânica de ossos e dentes, e biomoléculas como colágeno (Lins, 2003; Allegrini et al., 2005).

A implantação iônica é descrita como uma importante ferramenta na modificação superficial do titânio (Sioshansi, 1996). Em baixas energias (unidades de keV[4]), a implantação pode ser realizada em atmosfera de plasma criado pela espécie química a ser implantada (Pelletier, 2005; Alves, 2007; Liu, 2004) como hidrogênio com plasma de água (Xie, 2005; Mozzaquatro, 2006) e sódio (Maitz, 2005). Em energias mais altas, a implantação de cálcio está referenciada como ativador da superfície de titânio em ensaios *in vitro* (Hanawa, 1997; Krupa, 2001; Braceras, 2002; Jinno, 2004; Braceras, 2005; Nayab, 2005), utilizando, por exemplo, fósforo (Krupa, 2002, 2005); e combinação de cálcio e fósforo (Wieser, 1999; Tsyganov, 2002; Krupa, 2005).

## Implantação Iônica

A implantação iônica pertence a uma classe de processos físicos, onde átomos ou moléculas são acelerados em potenciais de dezenas de kV em direção a um material alvo. Neste processo, os íons colidem com o material alvo, incorporando-se ao material (dopando-o). Além de se instalar como um elemento estranho ao material, as colisões provocam danos estruturais à rede cristalina, deslocando átomos das suas posições iniciais, e criando forças então

[3] Tabacniks, M.H. Relatório de Pesquisa, 10/06/2005.
[4] A unidade eV (electron-volt) equivale a energia cinética que um elétron adquire ao ser acelerado por um potencial de 1V. Em unidades do SI equivale a $1{,}601 \cdot 10^{-19}$ J.

inexistentes entre os constituintes do cristal (Tian, 1998). A dopagem, isto é, a incorporação do íon no material altera propriedades cristalinas, dependendo das características do íon implantado. Na indústria de semicondutores, a implantação iônica é fundamental pois altera a condutividade elétrica do material dopado, com a formação de vacâncias ou lacunas, para a formação de semicondutores tipo-*n* e tipo-*p* respectivamente, que criam junções com propriedades elétricas chaves para a microeletrônica atual na fabricação de circuitos integrados (transistor). (Campbell, 1996; Nastasi, 2008)

Materiais tipo-*n* ou tipo-*p* são obtidos conforme a espécie química do dopante. Na fabricação de semicondutores tipo-*n*, a implantação de fósforo, por exemplo, sobre óxido de titânio, gera defeitos pontuais chamados de vacâncias, devido à característica do dopante (família 5A). Os átomos de titânio são deslocados de suas posições reticulares, sendo substituído na rede pelos átomos de fósforo. Com cinco elétrons na última camada, quatro deles fazendo ligações com os vizinhos, mantém um elétron na camada de valência, produzindo uma vacância. A densidade de elétrons livres aumenta, aumentando a condutividade do material, observado pelo aumento da corrente elétrica convencional. O inverso acontece com dopantes da família 3A. Seus três elétrons da camada de valência criam na rede, lacunas, isto é, a falta de um elétron (carga líquida positiva). Dopantes como o boro, criam então semicondutores tipo-*p*. O saldo positivo (ou lacunas em excesso) resulta em aumento de condutividade elétrica, já que permitem que elétrons livres ocupem essas posições. A corrente elétrica, neste caso é inversa ao convencional, como se existissem correntes elétricas de buracos ou lacunas (cargas positivas). Os primeiros estudos foram realizados com implantação de $He^{+}$ na década dos anos 1950, com a intenção de aumentar a densidade dos semicondutores e diminuir a largura da banda de condução (Russel, 1952 apud Dearnaley, 1974). Atualmente, a implantação iônica é um dos processos chave na tecnologia de semicondutores (Nastasi, 2008).

A interação dos íons com a superfície do material dá-se principalmente por dois tipos de colisões: elásticas (com os núcleos dos átomos do material); e inelásticas (com os elétrons do meio). A perda de energia é denotada como poder de freamento e pode ser determinada através de curvas semi-empíricas do modelo de Lindhard-Scharff-Schitt (LSS), para energias entre 10-1000 keV para diversos substratos (Moller, 2004). Os efeitos em cascata, pela perda sucessiva de energia até a parada total do íon incidente, podem ser estudados por simulação de Monte Carlo, que permite também obter aproximações para as distribuições (aproximação gaussiana) em profundidade (penetração ou alcance) e o pico de concentração (SRIM, 2008).

Esquematicamente na Figura 5, está mostrada uma trajetória possível de um íon incidente colidindo com o material. Na interface do sólido, colisões elásticas dos íons incidentes podem erodir a superfície (*sputtering*), desbastando-a. Internamente, as colisões elásticas alteram a direção dos íons incidentes, transferindo energia para os átomos da rede. As colisões elásticas são modeladas como colisões dos centros de massa de esferas sólidas interagindo através da força repulsiva coulombiana. Nas colisões inelásticas, há partição da energia dos íons incidentes nas excitações eletrônicas e ionizações atômicas produzidas. A modelagem da transferência de energia possui caráter semi-clássico utilizando aproximações das interações da função de onda de cada elétron com a função de onda do íon incidente. Os principais danos na rede acontecem nesse tipo de espalhamento, já que a perda de energia gera uma cascata de eventos de ionização, deslocando os átomos de suas posições iniciais (Nastasi, 2008).

A erosão atômica (*sputtering*) e o perfil de concentração em profundidade podem ser avaliados em função da distribuição aleatória que regem as colisões. Simulação computadorizada, como a realizada pelo programa SRIM – *The Stopping and Range of Ions in Matter* (2008), que utiliza o Método de Monte Carlo, pode determinar a taxa de erosão (razão entre a quantidade de átomos da superfície erodidos e a quantidade de íons incidentes) bem como o perfil em profundidade, caracterizado por uma distribuição Gaussiana dada pelos alcances projetados das trajetórias nas três dimensões. O modelo físico considera principalmente a energia depositada na superfície frente às energias de ligação entre os átomos presentes no material substrato. As energias de ligação podem ser aproximadas através de energias de coesão e as energias depositadas como função do poder de freamento nuclear (*stopping power*). Em substratos não monoatômicos, a taxa de erosão é diferente para cada espécie química já que a relação de massas faz parte do modelo físico das colisões.

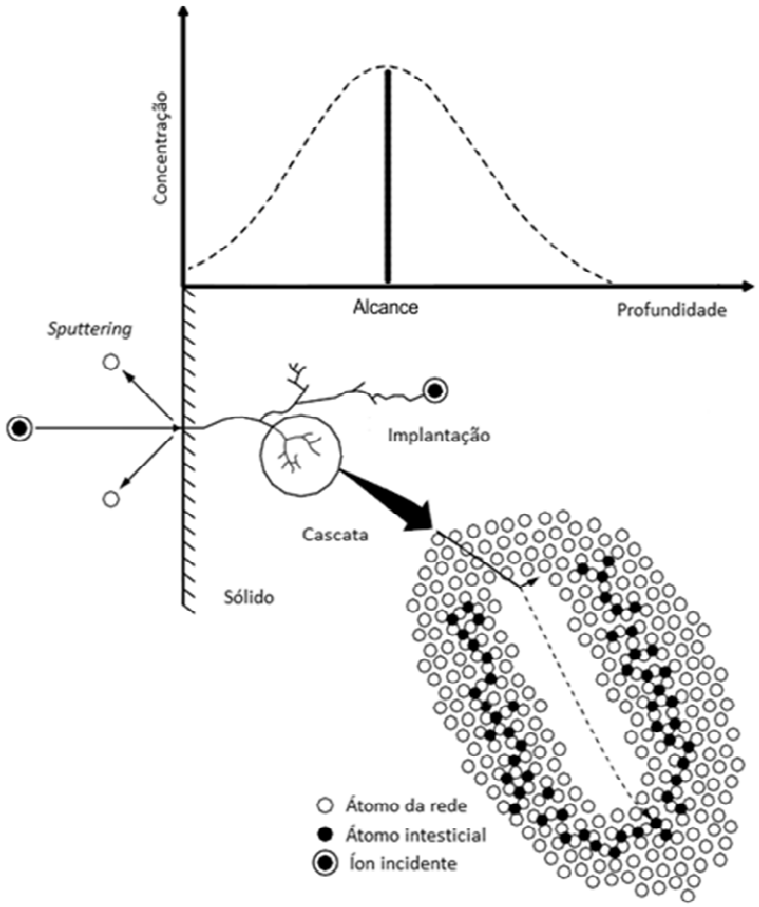



Figura 5: Esquema da cascata de colisões que ocorrem na implantação iônica. Adaptado de Nastasi, 2008[5].

As alterações produzidas pela implantação iônica na superfície do material, seja pelo desbaste por *sputtering*, seja pela ação da energia depositada pelo íon incidente, bem como as alterações das características químicas internas com a inclusão de novos elementos químicos, ou alterações estruturais com os defeitos pontuais das colisões eletrônicas, ou alterações elétricas com a criação de vacâncias ou lacunas devem ser avaliadas quanto ao possível risco biológico que estas modificações podem trazer. Ou vantagens sobre a superfície não modificada. Em amostras onde é possível realizar testes *in vitro*, a observação da viabilidade celular é um meio rápido e barato para avaliar a citotoxicidade dos constituintes interagentes da superfície. A avaliação da molhabilidade da superfície também permite avaliar alterações de como a superfície modificada interage com a água, principal carreador de biomoléculas. E constitui-se de técnica amplamente utilizada (McGuire, 1993; Vogler, 1998; Sklodowska, 1999;Bet, 2003).

[5] Nastasi, M. XV JAS Summer School. São Paulo: 17-23 February 2008

**Ângulo de Contato**

Com a vantagem de ser relativamente simples e de baixo custo, a Análise de Ângulo de Contato (CAA – Contact Angle Analysis) é amplamente empregada na indústria química, em estudos de adesividade e molhabilidade de superfícies em contado com determinadas substâncias de interesse químico-comercial. O formalismo não é trivial, não inteiramente conhecido, dependente quimicamente e topograficamente da interface líquido-sólido e líquido vapor, e as medidas realizadas não permitem uma correlação imediata com os fenômenos de interesse médico. Mas, trata-se de uma ferramenta que avalia como os diversos componentes orgânicos, presentes no meio aquoso dos diversos fluídos corporais, especialmente, plasma sanguíneo, carreador de citocinas e proteínas, são levados a toda a superfície do biomaterial, a partir do contato com os líquidos biológicos.

Em ensaios *in vitro*, por exemplo, o material utilizado nas garrafas de cultura é o poliestireno. O poliestireno em si, um polímero apolar, é hidrofóbico, isto é, há repulsividade pela água, apresentando ângulos de contato grandes. Tratamentos com atmosfera de oxigênio reativo tornam estas superfícies hidrofílicas, isto é, o trabalho para a formação de filme de água na superfície torna-se pequeno, traduzindo pequenos ângulos de contato. O processo consiste em criar carga líquida negativa com radicais hidroxila formados na cadeia polimérica pelo oxigênio reativo. Células de mamíferos não aderem ao poliestireno hidrofóbico e não proliferam. A superfície comercial conhecida como TCT (*Tissue Culture Treatment*), poliestireno exposto ao plasma de oxigênio é utilizado nas pesquisas com cultura celular desde a década dos anos 1960 (Corning®, 2010). Contudo, a resposta biológica *in vivo* é semelhante para ambos, com a formação de capsula fibrosa indistinguível tanto para o poliestireno tratado e não tratado (Ratner, 2004).

Atualmente, aceita-se que Galileo (1612) foi o primeiro a reconhecer o efeito da tensão superficial de líquidos, observando um material sólido, mais denso que a água, flutuando sobre uma lâmina d'água. Em 1805, Thomas Young[6] (apud Porcheron, 2005) definiu um modelo macroscópico para as tensões superficiais observadas em uma gota líquida, sobre uma determinada superfície sólida, utilizando a medida do ângulo de contato entre a gota, em equilíbrio térmico, e a direção horizontal da superfície (Figura 6). A equação de Young traduz-se

[6] YOUNG, T. Philos. Trans. R. Soc. London, Vol. 95, 1805.

pelo equilíbrio entre as tensões superficiais ($\gamma$) frente às interfaces sólido-vapor ($\gamma_{sv}$), vapor-líquido ($\gamma_{vl}$) e líquido-sólido ($\gamma_{ls}$) e líquido-vapor. No ponto de tríplice contato temos, então:

$$\boldsymbol{\gamma_{sv} = \gamma_{ls} + \gamma_{vl} \cdot cos\theta} \qquad \text{Equação 1}$$

Quando o líquido utilizado é água, diz-se que a superfície do material é mais ou menos hidrofílica quando apresenta ângulos de contato menores ou maiores, a uma dada superfície de referência. Contudo é comum indicar a característica de superfície hidrofílica, para ângulos medidos inferiores a 60°, e hidrofóbica para ângulos superiores a 120°, independente das características da superfície em estudo: topografia e ambiente químico.

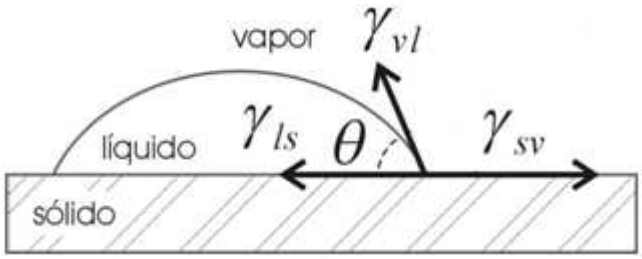



Figura 6: Esquema de uma gota, em equilíbrio térmico com uma superfície sólida horizontal, num ambiente saturado de vapor, e a representação das tensões superficiais.

Historicamente, a interpretação, que Young forneceu, para sistemas apolares, homogêneos e sólidos com superfícies livres de irregularidades e rígidas, pode também ser entendida quando Dupré[7] (1869 apud Good, 1993) introduziu o conceito de trabalho de adesão (variação da energia livre) realizado por unidade de área, dos componentes apolares ($W_a^d$). Além das interações dispersivas (d) entre pares apolares, provenientes das forças de Lifshitz-van der Waals, há interações não dispersivas ($W_a^{nd}$), ou também denominadas de interações de seus componentes ácido-base de Lewis, ou seja:

$$\boldsymbol{W_a = W_a^d + W_a^{nd}} \qquad \text{Equação 2}$$

O componente $W_a^{nd}$ pode ser descrito, como sugere Jensen (1980), como uma interação assimétrica assim como no caso eletrostático, e ser escrito como uma interação entre os pares doadores de elétrons ($\gamma_i^-$ e $\gamma_j^-$) e os aceptores de elétrons ($\gamma_i^+$ e $\gamma_j^+$) do binômio da inte-

[7] DUPRÉ, A. Theorie Mechanique de la Chaleur. Paris: Gauthier-Villars, 1869.

ração ($i$ - sólido, $j$ - líquido). Van Oss, Chaudhury e Good (1984) escrevendo os trabalhos de adesão como médias geométrica das energias livres de coesão independentes coloca em termos de energia livre:

$$\boldsymbol{\gamma_{vl}(1 + cos\theta) = 2 \cdot \sqrt{\gamma_{vl}^{d}\gamma_{sv}^{d}} + 2 \cdot \sqrt{\gamma_{vl}^{+}\gamma_{sv}^{-}} + 2 \cdot \sqrt{\gamma_{vl}^{-}\gamma_{sv}^{+}}} \qquad \text{Equação 3}$$

Dados compilados por Della Volpe e Siboni (1997) para diferentes líquidos (Tabela 1) permitem inferir propriedades dos componentes ácido-base da superfície em estudo a partir das tensões (energia livre) de superfície, indiretamente medidas através da análise do ângulo de contato. Fowkes (1985) observou que, para uma variedade de interfaces, a relação entre a componente não dispersiva do trabalho de adesão é linearmente dependente da quantidade $\gamma_{vl} - \gamma_{vl}^{nd}$. Lembrando que $\gamma_{vl}$ é a tensão superficial conhecida para os líquidos e independe do sólido interagente.

Tabela 3: Valores de tensão superficial ($\boldsymbol{\gamma_{vl}}$), energias livres de coesão dispersivas ($\gamma_{vl}^{d}$), não dispersivas ($\gamma_{vl}^{nd}$) e componentes da interação ácido-base ($\gamma_{vl}^{+}$ e $\gamma_{vl}^{-}$) para alguns líquidos. Unidades em mJ/m$^2$.

| **Líquido** | $\boldsymbol{\gamma_{vl}}$ | $\boldsymbol{\gamma_{vl}^{d}}$ | $\boldsymbol{\gamma_{vl}^{nd}}$ | $\boldsymbol{\gamma_{vl}^{+}}$ | $\boldsymbol{\gamma_{vl}^{-}}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Água | 72,8 | 21,8 | 51,0 | 65,0 | 10,0 |
| Glicerol | 64,0 | 34,4 | 29,5 | 16,9 | 12,9 |
| Etilenoglicol | 48,0 | 31,4 | 16,4 | 1,58 | 42,5 |
| Diiodometano | 50,8 | 50,8 | 0 | 0 | 0 |

Fox e Zisman (1952) introduziram um método empírico de estimar o valor da tensão superficial do sólido ($\gamma_{sv}$), i.e., a energia livre de superfície, a partir de medidas do ângulo de contato observadas em presença de uma série de líquidos, com $\gamma_{vl}$ conhecidos, sobre a superfície:

$$\boldsymbol{\gamma_{sv} = \frac{1 - a}{b}} \qquad \text{Equação 4}$$

$a$ e $b$ são os coeficientes linear e angular, respectivamente, do ajuste de reta entre os valores experimentais de $cos\theta$ em função de $\boldsymbol{\gamma_{vl}}$. Ou seja, $\boldsymbol{\gamma_{sv}}$ é obtido na extrapolação para $cos\theta = 1$. A justificativa deste ajuste se apresenta tal que para $\theta = 0$, $\gamma_{ls} = 0$.

Superfícies hidrofóbicas não deveriam ser adequadas à cultura celular, como acontece com o poliestireno. Alterações de superfície pela quebra das cadeias do poliestireno e a exposição de radicais carregados viabilizam a cultura de células. A correlação é positiva para a hidrofilicidade e é utilizada como argumento pelas empresas fabricantes de garrafas de cultura (Corning®, 2010). Assim como acontece em ensaios *in vivo*, o ângulo de contato, que traduz a hidrofilicidade da superfície, não tem correlação com a resposta celular nos ensaios *in vitro*. A tradução é que adesividade das células cultivas possuem parâmetros não correlacionados com as medidas de ângulo de contato. Neste trabalho, as superfícies modificadas pela implantação apresentaram alta hidrofobicidade. Contudo os resultados demonstram que os eventos de adesão, crescimento (proliferação) e diferenciação celular ocorreram.

**Ensaio *in vitro***

A grande contribuição dos ensaios *in vitro* é o acesso rápido às informações sobre a compatibilidade do tecido alvo, através da cultura de células de linhagens adequadas ao sítio que o biomaterial será exposto, evitando sacrifício desnecessário de animais em estudos com materiais inapropriados (Pearce, 2007). A observação da habilidade de adesão celular sobre a superfície demonstra que o início, de uma série de eventos sucessivos que a cultura celular passará, foi bem sucedido. Características físicas de ancoramento mecânico e como as biomoléculas vão interagir determinarão, *a priori*, como as células irão popular toda a superfície disponível (proliferação). Dependendo do tipo de ensaio, a importância se dá na morfologia que a célula se apresenta já na fase de adesão. Em alguns casos, apenas a relação do número de células mortas e aderidas já indicam grau de citotoxicidade. Em outros, a expressão genômica é avaliada, no sentido de observar o metabolismo naquele ambiente alterado pelo biomaterial. Os produtos da atividade celular, sejam enzimas secretadas, ou produtos de síntese de matriz extracelular, também podem ser avaliadas (Ratner, 2004).

Cultura Celular

A técnica de cultura de células para a utilização em pesquisas científicas data do início do século XX. Peres e Curi (2005) citam um início em 1912 com os trabalhos de Carrel com a manutenção de tecidos orgânicos vivos fora do organismo animal, e que somente em 1952, Gey, Coffman e Kubicek realizaram os primeiros estudos de cultura de células com capacidade proliferativa. Nove anos depois, em 1961, Hayflick e Moorhead publicam os primeiros

estudos de cultura seriada de células humanas. De maneira geral, as células a serem cultivadas são adquiridas de tecidos vivos animais. Técnicas de criopreservação permitem mantê-las viáveis sob armazenamento em nitrogênio líquido. A maioria dos tecidos dos mamíferos é cultivada aderida em placas de cultura (ou garrafas de cultura). A nutrição é realizada por difusão com meios de cultura específicos ao tecido de origem, contendo nutrientes celulares, solução tampão, e sinalizadores que permitem controle do ciclo celular e das atividades celulares. São então mantidas em ambiente controlado, com temperatura, umidade e atmosfera com 5% de $CO_2$.

Linhagens celulares são aquelas quando todas as células da cultura estão aptas a proliferarem, sob as condições *in vitro*, indeterminadamente. Em outras situações, as células, ou possuem tempo finito em cultura, ou não proliferam. Em alguns casos, a engenharia genética é utilizada para "perpetualizar" linhagens celulares através de transfecções que alteram a sinalização de morte celular e senescência (Peres e Curi, 2005). Para garantir que os ensaios possam ser repetidos em laboratórios em todo mundo, linhagens são distribuídas a partir de um banco de células que garantem reprodutibilidade, eficiência e disponibilidade para pesquisas com conhecimento prévio do comportamento nos estágios de adesão, proliferação, diferenciação e metabolismo (e.g. *American Type Culture Collection*, USA). O acompanhamento das etapas importantes ocorre com a visualização direta das células em microscópio retroiluminado sob as placas de cultura (Figura 7). Os ensaios *in vitro* costumam ser a primeira indicação de biocompatibilidade, já que a ocorrência de citotoxicidade altera padrões de crescimento, metabolismo e características da cultura. A citotoxicidade pode ser avaliada em cada avanço da cultura.

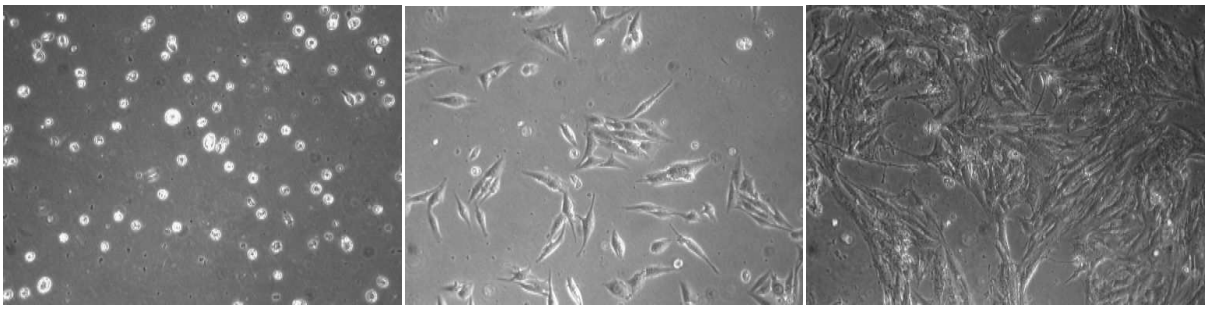


Figura 7: Da esquerda para a direita: células em suspensão, células aderidas à superfície (24h) e células conduzidas à confluência (10d). Linhagem MG-63 (ATCC). 10X.

A primeira barreira para o cultura de células é a adesão ao substrato. As células que se mantiverem em suspensão seguem uma via de morte auto-induzida (apoptose celular). A segunda etapa é a estabilização necessária para a proliferação: as células reconhecem o ambiente como biocompatível, disponibiliza o maquinário nuclear e celular para que proteínas sejam formadas e iniciam a divisão celular responsável pelo povoamento da placa. A terceira etapa é a proliferação onde as células se dividem até formarem um "tapete" celular que consiste numa única camada de células, até cada uma delas se relacionar intimamente com outras. A proliferação cessa quando o domínio de cada célula alcança a da sua adjacente. Dependendo da linhagem celular, esta etapa é encarada como a final. Em linhagens, por exemplo, de origem tecidual óssea, após a proliferação celular, pode se induzir a diferenciação celular, onde as células, consideradas fibroblastos (precursoras de alguns tipos celulares) se tornam mais especializadas. Neste caso, estímulo bioquímico induz uma diferenciação em células precursoras de tecido ósseo (osteoblastos). Estas, por sua vez, alteram seu comportamento, que pode ser observado pela proteômica (proteínas e enzimas produzidas) já que visam à formação de tecido ósseo primário. Uma característica possível desta fase é a observação da atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) e a formação de matriz extracelular mineral (Neel, 2007; Bronzino; 2007).

Quadro 2: Etapas da cultura celular pós semeadura de células.

| **Eventos** | **Adesão Celular** | **Proliferação** | **Diferenciação** |
|---|---|---|---|
| Iniciais | Glicoproteínas da membrana celular ancoram na superfície | Aumento do número de células; diferentes estágios de divisão celular | Especialização celular, alteração no metabolismo celular |
| Tardios | Situação favorável para a divisão celular | Confluência, formação de monocamada de células | Produtos extracelulares observados |

Atividade na Diferenciação Celular

Dá se o nome de diferenciação celular, a passagem de uma célula não especializada, normalmente presente nos tecidos, como células multipotentes de reserva (e.g. células-tronco), para uma especializada. Em todos os tecidos podem ser encontradas estas reservas. Por exemplo, no tecido hematopoiético (produtor das células sanguíneas) células-tronco da medula óssea, sofrem a primeira diferenciação produzindo duas novas células mais especializadas: as progenitoras mielóides, que darão origem à série branca e vermelha do sangue, e

progenitoras linfóides (segunda diferenciação). A série branca é caracterizada pelos leucócitos (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, mastócitos, basófilos). A série vermelha, pelos eritroblastos e megacariócitos. As progenitoras linfóides, pelos linfócitos (NK, T e B). Seguindo este mesmo raciocínio, ainda mais diferenciados, por exemplo, monócitos darão origem aos macrófagos, eritroblastos às hemácias, megacariócitos às plaquetas e linfócitos B aos plasmócitos. Normalmente a via de diferenciação não tem retorno, e.g. a hemácia humana especializada no transporte de $O_2$ aos tecidos que não possui organelas intracelulares, nem mesmo um núcleo.

Nas células progenitoras de tecido ósseo, a FA é um importante marcador da diferenciação celular em osteoblastos (Hakeda et al, 1985 apud Peter et al., 2005; Davies, 2000; Carvalho e Collares-Buzato, 2005). Osteoblastos são as células responsáveis pela inicialização da mineralização da matriz óssea. A FA cataliza a conversão de um monoester ortofosfórico em ortofosfato e está relacionada com a expressão gênica específica da osteogênese, ou seja, a formação do tecido ósseo (Bilezikian, 2008). Medidas indiretas de FA sérico, associadas à proteína ostecalcina indicam atividade osteoblástica (McGavin e Zachary, 2007). A expressão da FA na cultura celular possui alta correlação com biocompatibilidade *in vivo* (Krupa, 2001). Como informação adicional, a produção de FA, assim como pelo tecido ósseo, também é produzida pela placenta, mucosa intestinal, tecido hepático e renal (Latimer, Mahaffey e Prasse, 2003).

A atividade catalítica da FA pode ser mensurada observando a retirada, pela enzima, de um grupo fosfato, em uma solução tampão de 2-Amino-2Metil-1-Propanol (AMP), de um reagente opticamente inativo (4-Nitrofenolfosfato). A velocidade de formação de 4-Nitrofenol (opticamente ativo) é determinada em espectrofotômetro medida em 405 nm. O coeficiente de absorção molar do composto é de 18.450, que através da variação de atividade enzimática (velocidade), pode-se avaliar a concentração da FA. A leitura usual é em unidades por litro (U/L). No sistema internacional de unidades (SI), a atividade enzimática é dada em kat, que equivale a um mol de substrato convertido em 1 segundo. Entretanto, usa-se sua subunidade µkat/L. [U/L] = 0,0166 µkat/L.

Mineralização

Osteoblastos, nos ossos, estão localizados na superfície e sintetizam, transportam e organizam os diversos componentes da matriz óssea. Em fase anterior a completa diferenciação,

isto é, na fase não-mineralizada, essa matriz é tipicamente orgânica organizada em fibras de colágeno (matriz orgânica), e a célula recebe o nome de osteóide. Segue-se o processo de mineralização (matriz inorgânica), mediado pelo osteoblasto, garantindo as características de resistência mecânica típicas do sistema esquelético. Uma vez que o osteoblasto esteja cercado pela sua matriz inorgânica, principalmente por hidroxiapatita (hap), este recebe o nome de osteócito. Antes do processo de síntese de matriz óssea, os osteoblastos estabelecem prolongamentos citoplasmáticos entre si, permitindo que haja comunicação entre as células envoltas pela matriz inorgânica. Tais prolongamentos recebem o nome de canalículos e, alcançando um vaso sanguíneo próximo, garantirão a nutrição das células "aprisionadas".

Na cultura celular, osteblastos da linhagem comercial MG-63 (ATCC) também se apresentam como células superficiais, e na fase de diferenciação secretam matriz inorgânica (Santos, 2008). É possível observar a presença de fosfatos (através de espectroscopia de infravermelho) e, a assinatura cristalográfica da difração de raios X mostra a presença de hap: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$; bem como outros fosfatos: $Ca_8H_2(PO_4)$ e $Ca_2(P_4O_{12})$. A estequiometria da relação cálcio e fósforo não foi determinada por Santos (2008), que permitiria acrescentar informação importante para os candidatos cristalinos presentes. No presente trabalho, medidas de concentração elementar foram obtidas pela técnica de PIXE (*Particle Induced X-Ray Emission*) por se tratar técnica analítica elementar, com limites de detecção adequadas onde é possível determinar simultaneamente concentrações elementares, principalmente de cálcio e fósforo, e de outros elementos químicos presentes. Com amostras de baixa pressão de vapor, utiliza-se a técnica em ambiente atmosférico (PIXE externo), nos demais casos, a irradiação ocorre em câmara de vácuo (PIXE convencional)

*PIXE*

PIXE é uma técnica espectroscópica onde átomos do alvo são excitados pela colisão de partículas aceleradas. A desexcitação que ocorre através de transições eletrônicas: de camadas mais externas para a vacância criada de outra mais interna gera um quantum de radiação característico do elemento químico, cujo valor é a diferença de energia das camadas envolvidas na transição. As transições de interesse, nas energias comumente utilizadas nas colisões, são aquelas que possuem como base a camada K identificada pelos seus números quânticos $n = 1$, $\ell$=0, $s = \pm 1/2$ e $j = 1/2$, que envolvem as camadas L e M, e possuem energias determinadas pela lei de Moseley (Leighton,1959), da ordem de 1keV a 30keV (região sensível do detector).

A relação entre a quantidade de raios X emitidos $dX_i$, e a quantidade do elemento químico $i$, presente no alvo, é dada por:

$$\boldsymbol{dX_i = \sigma_i(E) \cdot P(x', y') \cdot m_n(x', y', z')dv} \quad \text{Equação 5}$$

onde $m_n$ é massa elementar referente ao elemento químico presente no alvo, no volume $dv$, $\sigma_i(E)$ é seção de choque de produção de raios-X, a partir de um feixe de partículas de energia $E$ e densidade superficial $P(x', y')$. A quantidade de raios X detectados $dN_i$ é uma fração dos raios X produzidos dado a reduzida área do detector, definido pelo seu ângulo sólido $\Omega/4\pi$, a eficiência de detecção $\varepsilon_i$:

$$\boldsymbol{dN_i = \frac{\Omega}{4\pi} \cdot \varepsilon_i \cdot dX_i} \quad \text{Equação 6}$$

Considerando um feixe homogêneo e coletado a carga total Q depositada sobre o alvo, temos a densidade superficial de partículas dada por:

$$\boldsymbol{P(x', y') = \frac{Q}{q \cdot e \cdot s \cdot cos\alpha}} \quad \text{Equação 7}$$

onde $q$ é o estado de carga do íon incidente, $e$ é o valor da carga elétrica elementar, $s$ é a seção transversal do feixe e $\alpha$ é o ângulo entre o feixe de partículas incidentes e a normal da superfície da amostra.

Considerando a identidade a seguir, onde $\rho_n$ é a densidade do elemento presente no alvo:

$$\boldsymbol{m_n dv' = \frac{N_0}{A_n} \rho_n \cdot s \cdot dz'} \quad \text{Equação 8}$$

e demais equações, temos a equação do PIXE para alvos finos:

$$\boldsymbol{n_i = \frac{\Omega}{4\pi} \cdot \varepsilon_i \cdot \frac{N_0}{A_n} \frac{Q}{q \cdot e \cdot cos\alpha} \cdot \sigma_i(E) \cdot (\rho_n dz)} \quad \text{Equação 9}$$

onde ainda é possível escrever como:

$$(\boldsymbol{\rho_n dz}) = \frac{\boldsymbol{n_i}}{\boldsymbol{r_i \cdot Q}} \qquad \text{Equação 10}$$

Que se traduz como a densidade superficial, de um filme fino, do elemento $n$ determinado através da quantificação dos raios X detectados ($n_i$), da carga total depositada sobre o alvo ($Q$), e do fator de resposta nominal para alvos finos, para determinada linha espectral, e que engloba os parâmetros do particular arranjo experimental: a geometria, a eficiência de detecção e eletrônica embutida ($r_i$). Os fatores de respostas podem ser determinados experimentalmente utilizando alvos finos padrões, onde a espessura do filme é conhecida ($\rho_n dz$), geralmente da ordem de dezenas de μg/cm$^2$.

A técnica contempla medidas médias, já que a largura do feixe de partículas é da ordem de milímetros de diâmetro. PIXE com feixes da ordem de micrometros e controle de posição poderia discriminar como a matriz mineral está conformada na superfície do biomaterial. O arranjo experimental do Laboratório de Análises de Materiais por Feixes Iônicos (LAMFI) do IFUSP não possui tal configuração. Assim, dentro da região irradiada não é possível avaliar a homogeneidade do biofilme mineralizado formado pela cultura celular. Como ferramenta analítica de imagem, a microscopia eletrônica de varredura, garante observar como a camada de matriz extracelular está organizada (homogeneidade da cobertura do biofilme).

Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura consiste em utilizar um feixe de elétrons, para "iluminar" a superfície em estudo, obtendo resoluções que dependem do comprimento de onda associado à energia do elétron incidente, podendo chegar a resoluções nanométricas (Nascente et al., 1997). Assim, há a necessidade de uma fonte de elétrons, diferença de potencial para aceleração, controle de focalização e varredura do feixe eletrônico, um sistema de observação dos fenômenos que ocorrem na interação entre os átomos ou elétrons do material e do canhão de elétrons, e um sistema de vácuo para manter em baixas pressões (Figura 8).

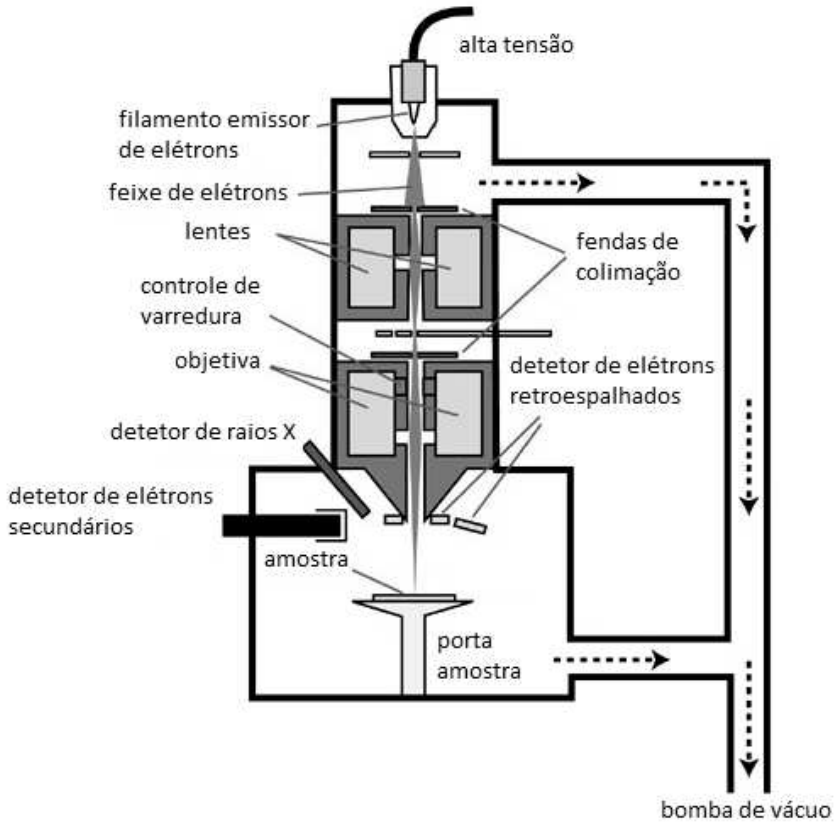



Figura 8: Esquema de um microscópio eletrônico de varredura.

A fonte de elétrons consiste num filamento com extremidade bastante aguda que emite elétrons sob ação de um campo elétrico bastante intenso. As lentes focalizadoras são eletromagnéticas. A varredura é controlada eletrostáticamente. A interação dos elétrons focalizados sobre um ponto na superfície do material induz principalmente a emissão de elétrons secundários (do material), o retrospalhamento dos elétrons incidentes e a indução de produção de radiação X característica. Este último permite criar mapas elementares através de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) que determinam os raios X característicos provenientes da excitação eletrônica e, consequentemente, a identificação do elemento químico excitado.

Os elétrons secundários são gerados por colisões inelásticas dos elétrons do feixe com elétrons dos átomos que compõe a amostra. Parte de sua energia é perdida para esses elétrons, sendo ejetados se forem energeticamente competentes para vencer a função de trabalho do material. A corrente elétrica gerada forma imagens topográficas dada a característica da emissividade secundária de elétrons (superficial). Nos elétrons retroespalhados, a colisão é elástica devido à interação com os núcleos dos átomos. Quanto maior o número atômico (Z), maior a probabilidade de ocorrência desses eventos, dado o potencial Coulombiano. Assim, nas ima-

gens de elétrons retroespalhados, elementos químicos de maiores Z produzem regiões mais “brilhantes”.

**Correlações**

É possível determinar algumas relações:

- A análise de ângulo de contato traz informações sobre como a superfície interage com líquidos, em particular a água. Para a cultura celular, constitui característica para o ancoramento de oligoproteínas de membrana na superfície. A correlação parece ser fraca quando se trata resultados *in vivo*.
- A observação da proliferação celular é a maneira mais adequada de estudar o ancoramento celular, já que só há proliferação de células após a adesão delas à superfície.
- A etapa seguinte a proliferação, a diferenciação celular, pode ser avaliada pela secreção de FA, já que esta é referenciada como produto somente da atividade osteoblástica.
- O produto final da diferenciação osteoblástica é a matriz mineral, e pode ser avaliado por medidas de concentração de cálcio e fósforo, já que a atividade de mineralização é exclusiva dos osteoblastos.

**OBJETIVOS**

1. Avaliar a metodologia de ensaio *in vitro* utilizada na investigação de biocompatibilidade de materiais.
2. Padronizar procedimentos experimentais que indiquem biocompatibilidade de materiais.
3. Validar a técnica com biomateriais conhecidos.
4. Avaliar a biocompatibilidade de biomaterial conhecido, modificado por implantação iônica de P e $BF_2$.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## Amostras

Foram consideradas quatro superfícies (Figura 9):

1. A placa de cultura (poliestireno TCT) como balizador do ensaio (referência), já que se trata de superfície utilizada em pesquisas com cultura celular;
2. Discos de titânio com 12,7 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, tratados com duplo ataque ácido (superfície comercial), consolidado como material adequado a implantes dentários;
3. Discos de titânio com 12,7 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, tratados com duplo ataque ácido (superfície comercial), e modificado através de implantação iônica de fósforo, com energia de 30 keV na dose de $5 \cdot 10^{15}$ átomos/cm$^2$;
4. Discos de titânio com 12,7 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, tratados com duplo ataque ácido (superfície comercial), e modificado através de implantação iônica de flúor e boro, com energia de 77 keV na dose de $5 \cdot 10^{15}$ átomos/cm$^2$.

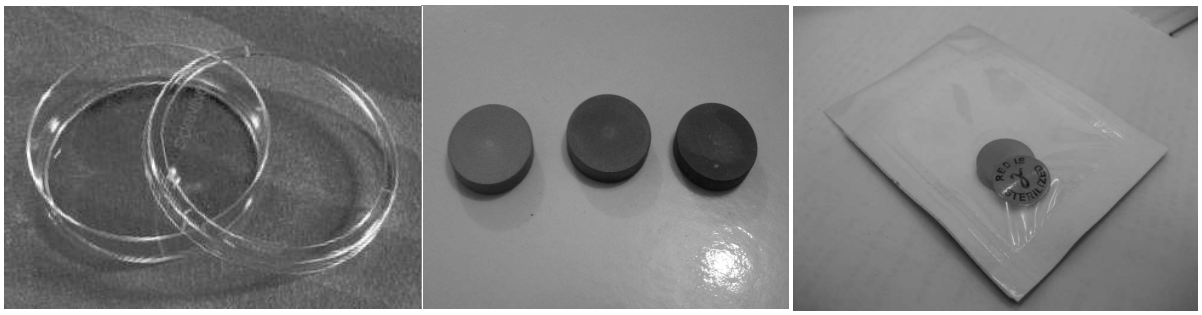


Figura 9: Da esquerda para a direita: Placa de cultura Corning® TCT (retirado do Catálogo Corning®, 2011), discos de titânio, discos de titânio já esterilizado.

## Implantação Iônica

As implantações iônicas foram realizadas no Laboratório de Implantação Iônica, do Laboratório de Microeletrônica (LME), do departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos, da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, com implantação iônica de fluor (F)

e fósforo (P), com energias de 30 keV em doses de $5 \cdot 10^{15}$ átomos/cm$^2$ e incidência perpendicular à superfície. As implantações de F foram realizadas através da aceleração concomitante com boro (B) na forma de $BF_2$.

Por que $BF_2$ e P?

Como constituintes da principal matriz mineral óssea, cálcio e fósforo constituem em elementos químicos de primeira elegibilidade para se ter na superfície de implantes. Vem sendo pesquisados as alterações com implantação de fósforo (Krupa, 2002, 2005); cálcio e fósforo (Wieser, 1999; Tsyganov, 2002; Krupa, 2005). As doses citadas estão entre $10^{16}$ e $10^{18}$ átomos/cm$^2$ com energias acima de 40 keV. Os estudos associam a técnica de implantação apenas ao aumento da resistência à corrosão. Testes *in vitro* indicam que tais superfícies modificadas são biocompatíveis. A utilização de flúor como elemento modificador da superfície tem sido associado aos resíduos de ataques ácidos utilizando ácido fluorídrico (Liu, 2004). A implantação iônica de flúor como bioativador foi apenas descrita recentemente por Liu (2008), com aumento da biocompatibilidade pelo aumento do número de células em cultura. O flúor altera a hidroxiapatita, em substituição da hidroxila, formando a fluorapatita $Ca_5(PO_4)_3F$, com propriedades químicas de maior resistência aos ataques ácidos (e.g. associados à cárie dentária). A fluorapatita foi utilizada como cobertura em superfícies de titânio, apresentando resposta favorável em ensaios in vitro (Motanaro, 2002). Neste trabalho, a implantação de flúor está associada à técnica de implantação comum de $BF_2$ na fabricação de semicondutores tipo *p*. Nestes, são as modificações que o boro provoca que alteram as propriedades elétricas. Normalmente, as concentrações de boro, no tecido ósseo, são mais altas que em outros tecidos (Moseman, 1994), sugerindo que o tecido ósseo é um reservatório para este micronutriente. Assim, $BF_2$ implantado é um candidato à biocompatibilidade.

Por que a dose e a energia escolhidas?

As condições experimentais seguiram os modelos de modificação de semicondutores, já estabelecidas na microeletrônica, e utilizadas no LME, desde os anos 70 e 80, com implantações sobre silício (Si) e óxido de titânio, para dopagem de fonte e dreno de transistores (Martino, 1988; Furlan, 1990; Peres, 1990). As energias de 30 keV em doses de $5 \cdot 10^{15}$ átomos/cm$^2$ aumentam a condutividade elétrica do óxido de titânio (Wang, 2009). As implantações de F foram realizadas com $BF_2$, com energia de 77 keV, que garantem íons de flúor com 30 keV e B com 17 keV. As implantações de P foram realizadas com energia de 30 keV. A-

através de simulação computadorizada (SRIM, 2008), os perfis de implantação foram avaliados (Figura 10).

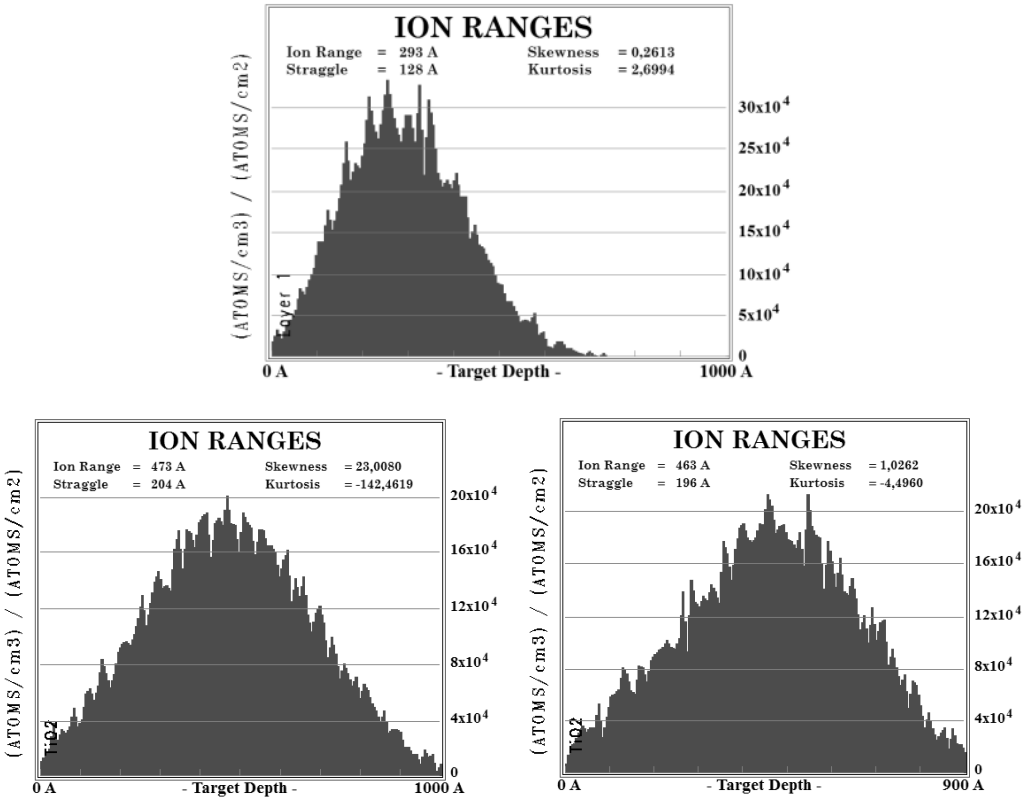



Figura 10: Perfis das implantações avaliadas por simulação computadorizada (SRIM, 2008). A imagem superior corresponde à implantação de fósforo 30 keV; inferior à esquerda, a implantação de flúor 30 keV; à direita, a implantação de boro 17 keV.

As taxas de erosão (*sputtering*) da simulação computadorizada indicaram, para cada íon implantado (íon incidente) e suas respectivas energias, erosão preferencial de átomos de oxigênio em relação a átomos de titânio. Para cada átomo de titânio, cerca de três átomos de oxigênio foram removidos nos dois ensaios de implantação. A concentração dos íons implantados, na primeira monocamada de $TiO_2$ foi avaliada conforme os perfis já apresentados na Figura 10, com aproximação para uma distribuição gaussiana (Kudriavtsev,1999). A concentração relativa de íons implantados em PT e BFT é da ordem de 2% e 1%, para as implantações, dos átomos expostos na superfície. Os valores estão na Tabela 4. A densidade superficial de átomos nestas superfícies foram avaliadas em 1,4 $10^{13}$ (átomos de fósforo)/$cm^2$ em PT e 3,4 $10^{12}$ (átomos de boro)/$cm^2$ e 6,2 $10^{12}$ (átomos de flúor)/$cm^2$ em BFT.

Tabela 4: Valores apresentados pela simulação computadorizada (SRIM, 2008) das taxas de erosão atômica (*sputtering*) devido às implantações iônicas realizadas $\mathbf{Y_s}$; indicativo de erosão preferencial $\mathbf{Y_s(Ti)/}$

$\mathbf{Y_s(O)}$; relação entre a quantidade de íons implantados e quantidade de moléculas do substrato $\mathbf{[II]/[TiO_2]}$ na superfície.

| **Íon Incidente** | $\mathbf{Y_s(Ti)}$ $\frac{\text{átomos}}{\text{íon incidente}}$ | $\mathbf{Y_s(O)}$ $\frac{\text{átomos}}{\text{íon incidente}}$ | $\frac{\mathbf{Y_s(Ti)}}{\mathbf{Y_s(O)}}$ | $\frac{\mathbf{[II]^{(1)}}}{\mathbf{[TiO_2]^{(1)}}}$ | **Camadas de $\mathbf{TiO_2}^{(2)}$ Erodidas** |
|---|---|---|---|---|---|
| B | 0,1913 | 0,6564 | | 0,4% | |
| F | 0,3466 | 1,1800 | | 0,7% | |
| $BF_2$ | 0,5376 | 1,8364 | 0,2929 | | 3 |
| P | 0,7564 | 2,5400 | 0,2979 | 1,7% | 5 |

(1) Densidade superficial na primeira monocamada de $TiO_2$.

(2) Determinado em função da remoção de átomos de Ti.

As amostras de titânio, após as implantações realizadas, voltaram para a empresa SIN, onde foram embaladas e encaminhadas para esterilização. O processo de esterilização se deu em conformidade com a norma ISO 11137-2006, através de exposição à radiação gama. A Embrarad (terceirizada pela SIN) foi a empresa responsável pela irradiação. O processo físico de esterilização por radiação gama tem alto grau de confiabilidade e eficiência, pelas características de alta penetrabilidade da radiação. E, por não envolver agentes químicos, é livre de resíduos.

**Análise do Ângulo de Contato**

Medidas de ângulo de contato foram realizadas em aparato experimental desenvolvido pelo autor. Trata-se de uma base pesada, com matriz perfurada para montagem, um micropipetador manual conectado à ponta de latão (mesmas dimensões da ponta do micropipetador) através de um tubo de cobre. O arranjo (Figura 11) possui uma resistência elétrica que, com aumento de temperatura numa seção da ligação entre a ponteira e o micropipetador, expande o ar internamente e pipeta 10 µL de líquido, previamente aspirado no interior da ponteira, sobre a superfície em estudo. Tal procedimento diminui a incerteza associada ao experimentador comumente observado em goniômetros convencionais onde a pipetação da gota é realizada diretamente e manualmente. A velocidade de pipetação pode ser definida através de configuração de circuito microcontrolado, relé e bateria que fornece controle da taxa de aquecimento.

O tempo e a temperatura foram calibrados para que as condições de pipetação (velocidade) estivessem o mais próximo entre os ensaios. A montagem robusta diminui vibrações de manuseio do micropipetador. A mesa de aço possui pés ajustáveis que permitem alinhar horizontalmente, auxiliado por nível de bolha em duas direções. A matriz de montagem permite vários arranjos para a otimização das condições de luz e óptica na aquisição das imagens. As imagens foram captadas por uma câmera de vídeo para computador (*webcam*). O porta-amostra em acrílico alinha a superfície em estudo às condições da aquisição da imagem (foco e iluminação) e da altura entre a ponteira/gota e o material.

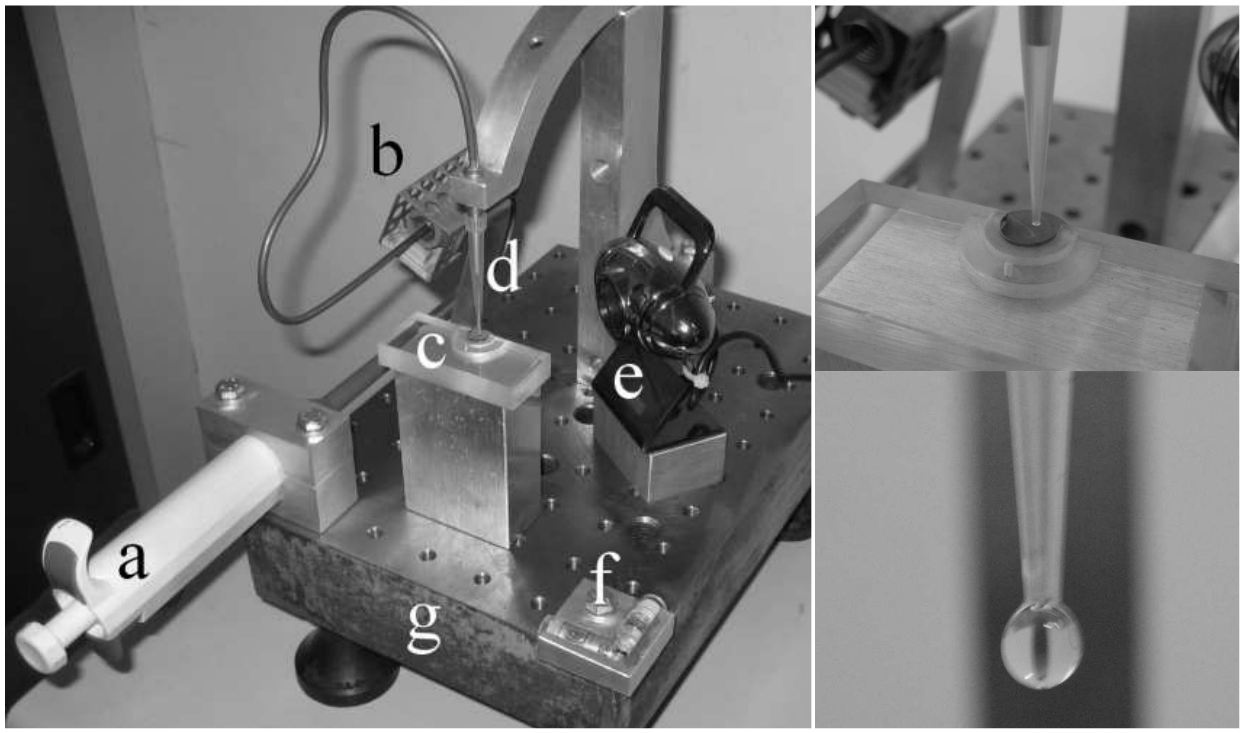



Figura 11: Micropipetador automatizado desenvolvido para observação dos ângulos de contato: (a) micropipetador; (b) resistência de aquecimento; (c) porta-amostras; (d) ponteira plástica; (e) câmera digital; (f) nível de bolha; (g) mesa maciça em aço; (h) disparador. No alto a direita, detalhe do porta-amostra e ponteira para micropipetação (distância constante), Em baixo a direita, detalhe da gota obtida (volume de 10 μL).

A obtenção do ângulo foi realizada ajustando-se elipses aos contornos no ambiente do software AutoCAD® da AutoDesk, e determinando segmentos de reta tangentes (Figura 12 e Figura 13). A incerteza geral para o ângulo de contato foi determinado em 0,5º, avaliado através da realização de repetidas medidas, utilizando-se um mesmo líquido e superfície. Dois líquidos foram utilizados: água deionizada que mede diretamente a molhabilidade da superfície (substância polar); e glicerina PA (Carlo Erba cod. 0453751), substância apolar, com a possibilidade de determinação da energia livre de superfície como já descrito.

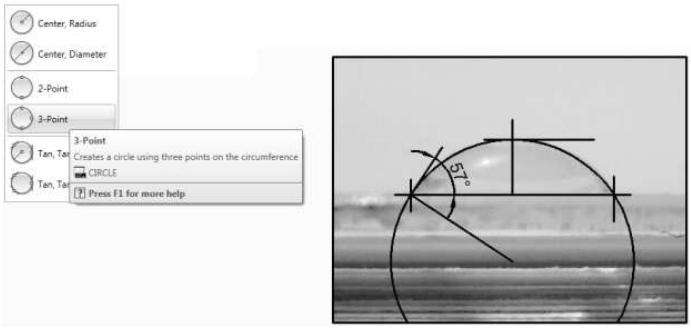



Figura 12: Determinação do ângulo de contato a partir da ferramenta *circle 3-point* do AutoCAD®. Os três pontos são determinados: dois deles nos pontos entre o limite da gota e a linha base da superfície; outro, tangente a superfície na margem superior. Ângulo entre a linha base e a tangente no ponto na interface ar-sólido-líquido é o ângulo de contato.

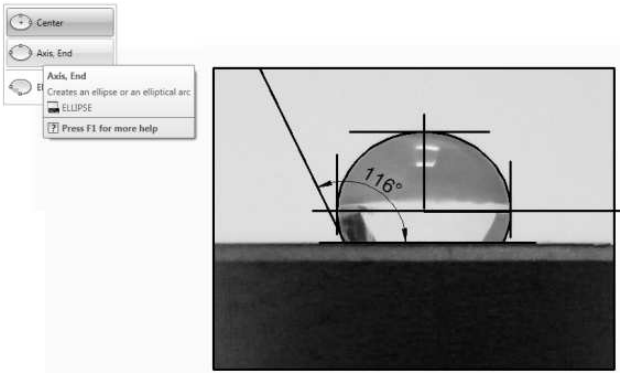



Figura 13: Determinação do ângulo de contato a partir da ferramenta *elipse axis, end* do AutoCAD®. O eixo é determinado pelo segmento de reta que liga retas verticais tangentes as margens da gota; o último ponto é tangente a superfície na margem superior. Ângulo entre a linha base e a tangente no ponto na interface ar-sólido-líquido é o ângulo de contato.

## Cultura Celular

A linhagem celular utilizada na cultura foi a MG-63, comercializada pela *American Type Culture Collection* – ATCC (cat. CRL-1427), proveniente de osteossarcoma humano. A linhagem foi cedida pelo Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LFR-FMUSP) e cultivadas no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Ambos laboratórios estão em conformidade com o nível 1 de biossegurança, necessário para a experimentação e manipulação da linhagem celular utilizada. Uma alíquota da linhagem celular foi transportada da FMUSP, em tubo para congelamento, criotubo, marca Corning® (cat. 430488), mantida em nitrogênio líquido a uma temperatura de aproximadamente -196 °C em botijão criogênico

junto a FMVZ-USP até a primeira etapa de replicação da cultura (garantia de quantidade suficiente de células em todo o período experimental).

A característica morfológica das células é de fibroblasto, com propriedades aderentes de crescimento. A descrição do produto, fornecido pela ATCC® encontra-se no Anexo 1. A linhagem MG-63 foi escolhida devido ao reconhecimento de propriedades correlacionadas dos ensaios *in vitro* ao sucesso em testes *in vivo* de integração de materiais xenobióticos ao tecido ósseo (Neel, 2007). O comportamento da MG-63 é típico de osteoblastos, células progenitoras de tecido ósseo (Anselme, 2000), e mimetiza as condições biológicas do sítio de utilização comum dos implantes de titânio dentários.

O meio de cultura utilizado baseia-se em 10% em volume de Soro Fetal Bovino (FBS - *Fetum Bovine Serum*) e restante de meio de cultura base D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). D-MEM é uma modificação proposta por Dulbecco (1959) do meio de cultura E-MEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) proposta por Eagle no mesmo ano (1959). A recomendação da ATCC® é de utilizar E-MEM para a cultura desta linhagem celular, contudo, dada a experiência adquirida pela LFR-FMUSP em utilizar D-MEM rotineiramente, foi utilizado D-MEM para a manutenção das células.

Na preparação do D-MEM foi utilizado vidraria estéril, água ultra pura (MilliQ®) e preparado em pó dos constituintes do D-MEM fornecido em saches pela Invitrogen® (cat. 12800-017), para preparo de 1000 mL de solução de meio base de cultura. As etapas de preparação envolveram a adição de 3,7 g de bicarbonato de sódio PA (NaHCO3), como tampão de pH, em 950 mL de água, a adição do D-MEM em pó, sob agitador magnético até a completa dissolução (aproximadamente 2 h), o ajuste do volume de água para 1000 mL, a medida do pH (concentração hidrogeniônica), realizada por pHmetro (Denver Instrument – modelo Basic) e a correção do pH, realizada com adição de HCl (ácido clorídrico) 1N, gota a gota, até o valor de 7,2 (0,2 abaixo do ideal para a cultura celular de 7,4), porque o processo de filtração tende a aumentar o pH. A solução foi filtrada em filtro esterilizante de acetato de celulose com porosidade 0,22 μm, Corning® (cat. 430626), sob garrafa Schott, com pressão de sucção de 70 kPa proveniente de um aspirador modelo Diapump® da Fanem® (São Paulo, Brasil), sob fluxo laminar da Trox® Technik (Curitiba, PR). A solução de D-MEM foi então mantida sob refrigeração a 5 °C.

A preparação do meio de cultura final foi realizada em pequenas quantidades de 50 mL, com 45 mL de meio base de cultura D-MEM e 5 mL de FBS, *South American* Gibco (cat. 12657-029), previamente descongelado, em tubo cônico para centrífuga, de 50 mL de capacidade, marca DB Falcon (cat. 352070). A degradação da L-glutamina em presença de FBS justifica a preparação fracionada, suficiente para a manutenção da cultura celular por um período de 10 dias (necessário para a confluência das células).

O descongelamento da alíquota da linhagem celular MG-63 deu-se pela imediata imersão do criotubo em banho-maria, a 37 °C, por 20 segundos, depois da retirada do botijão criogênico, com agitação constante. A alíquota já descongelada foi então diluída em 10 mL de meio de cultura a 37 °C, em tubo cônico para centrífuga, de 15 mL de capacidade, marca BD Falcon (cat. 352096), sob fluxo laminar. Seguiu-se a centrifugação a 1200 rpm, 250 G, em centrífuga Excelsa® II da Fanen®, modelo 206BL, por 10 min, e descarte do sobrenadante, que continha DMSO, crioprotetor tóxico. As células foram então ressuspendidas em 10 mL de meio de cultura e condicionada em frasco de cultura de 75 $cm^2$ de área, volume de 250 mL, com tampa ventilada e membrana filtrante de porosidade de 0,2 μm da Corning® (cat. 430641). Adicionou-se, como recomendação da ATCC®, 100 μL de solução antiobiótica, Gibco® (cat. 1747), que garante 1000 UI de penicilina, 1000 UI de estreptomicina e 2,5 μg de anfotericina B.

O frasco de cultura foi mantido em estufa climatizada a 37 °C, com umidade relativa de 98% e atmosfera de $CO_2$ a 5%, Shel Lab®. Após 24 h, as células já se encontravam aderidas à superfície do frasco, manifestando sua morfologia de fibroblasto. A rotina de acompanhamento da cultura começava, uma hora antes da manipulação da cultura propriamente dita, com higienização pessoal e desinfecção das superfícies de trabalho; a esterilização através de radiação ultravioleta da cabine de fluxo laminar por 20 min. Além, os meios de cultura D-MEM, resfriados, eram aquecidos em banho-maria por 20 min para atingirem a temperatura de 37ºC, juntamente com o descongelamento de soro fetal bovino para o preparo do meio D-10 (D-MEM com 10% de soro fetal). A desinfecção das superfícies externas da estufa de cultura era realizada com álcool etílico 70%, bem como as superfícies das garrafas, antes e depois da manipulação (saída e entrada da estufa). Como rotina, as culturas eram, assim que retiradas da estufa, submetidas à inspeção visual através de microscópio óptico. A cada 48 horas, a troca do meio de cultura era realizada, substituindo o meio de cultura anterior em meio D-10 recém-preparado, adicionados de solução antibiótica, conforme já descrito.

Após 10 dias, foi observada a multiplicação das células em cultura, momento em que foi realizado a subcultura em outros dois frascos de cultura. Para tal, o descolamento das células aderentes, tripsinizacão, foi realizado através de solução de tripsina e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), Gibco (cat. 15400-054), com concentração de 0,05% de PBS (tripsina em tampão fosfato salino) para cultura celular, isento de cálcio e magnésio. Então, após o descarte do meio de cultura, adicionou-se 2 mL da solução de tripsina-EDTA e se observou o progressivo descolamento das células (aproximadamente 2 min). A inativação da tripsina pelo FBS foi realizada adicionando meio de cultura num volume aproximado de 10 mL. Seguiu-se a centrifugação, em tubo cônico para centrífuga, de 15 mL de capacidade, e descarte do sobrenadante. Ressuspendeu-se em meio de cultura, num volume total de 30 mL, fracionado para o frasco original e outros dois, 10 mL em cada frasco, e adição de antibiótico em solução, sob fluxo laminar. E assim, três frascos de cultura celular foram para estufa após este procedimento.

Após novo período de 10 dias, as três garrafas de cultura foram submetidas ao procedimento de tripsinização, e a partir de uma delas, novas três garrafas para cultura celular. As células contidas nas outras duas garrafas de cultura foram congeladas, a partir da centrifugação de cada coleção de células, em tubo cônico para centrífuga, de 15 mL de capacidade, descarte do sobrenadante, ressuspensão em 1 mL de solução de congelamento, meio crioprotetor, composto por meio de cultura e 10% de DMSO, e envase em criotubo. Foram mantidos em nitrogênio líquido (botijão criogênico). Outros dois períodos de 10 dias foram considerados, com saldo de seis alíquotas de células preservadas em nitrogênio líquido, e outras três em estufa, permitindo que houvesse segurança na manutenção da linhagem (alíquotas congeladas) e disponibilidade imediata de células para os ensaios *in vitro* realizados.

Para os ensaios de aderência celular, o conteúdo celular das garrafas de cultura, após tripsinização, inativação da tripsina e centrifugação, foram ressuspendidas em meio de cultura com volume quantidade suficiente para 1 mL. A avaliação da quantidade de células presentes na suspensão ($Q_s$) foi realizada a partir da amostragem de um volume de 10 μL desta suspensão de células, diluído em outros 0,99 mL de solução de azul de metileno, e observadas em câmara de Neubauer, sob microscópio ótico. A quantidade de células observadas ($Q_o$) é representativa de um volume de $10^{-4}$ mL da amostra diluída, e corresponde ao volume da câmara de observação (Neubauer). Deste modo, com o fator de diluição de 1:100, tem-se a quantidade de células $Q_s$:

$$\boldsymbol{Q_s = 10^6 \cdot Q_o} \qquad \text{Equação 11}$$

Procedeu-se, então, a correção até o volume final ($V_s$) da suspensão de células para alcançar um total de $3{\cdot}10^5$ células/mL:

$$\boldsymbol{V_s = 2,97 \cdot 10^5 / Q_s} \qquad \text{Equação 12}$$

Assim, placas de cultura com 24 poços, seis fileiras de quatro poços, com diâmetro de 15,6 mm, com área de cultura de 1,91 $cm^2$, com tratamento para aderência celular, esterilizado por radiação gama, marca Corning® (cat. 3526) foram utilizados. Os discos amostrados, de 12,7 mm e 1,27 $cm^2$, foram colocados no fundo de cada poço e pipetados com 0,32 mL da suspensão de células, que garantiram $3{,}80{\cdot}10^4$ células sobre a área total do disco (Figura 14). A utilização da densidade celular de aproximadamente $10^4$ células/$cm^2$ é citada nos trabalhos de Le Guehennec et al. (2008), Lin (2007), Neel et al. (2007), Yonggang et al. (2007), Braceras et al. (2005), Huang (2004).

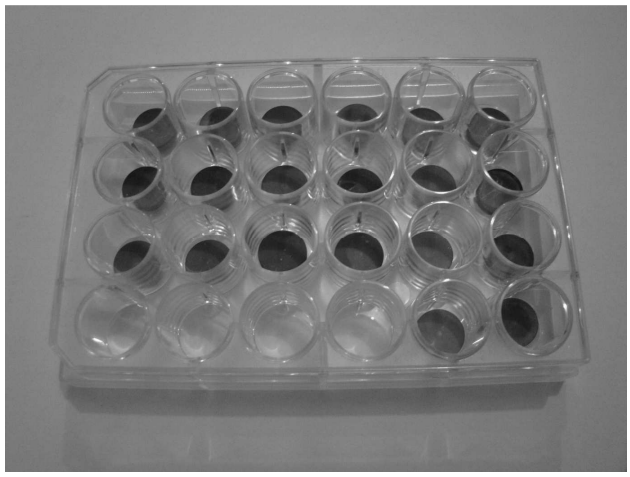


Figura 14: Placa de cultura com 24 poços condicionando os discos de titânio para cultura da linhagem MG-63.

Experimentalmente foi determinado que após 10 dias de manutenção da cultura celular, a confluência das células era atingida. A observação diária das placas de cultura se fez necessária para avaliar a viabilidade da cultura. A linhagem MG-63 em cultura, após a proliferação celular necessita de estímulo químico para se diferenciarem em osteoblastos. Esta sinalização bioquímica é dada através da adição, ao meio de cultura, de 100 µg/mL de ácido ascórbico PA (Sigma) e 5mM de β-glicerofosfato (Sigma), e mantida durante toda a fase de diferenciação osteoblástica. Ao tempo que se inicia com a adição destes reagentes é dado o

nome de período de estímulo que corresponde à fase de diferenciação celular e a formação dos núcleos minerais (Santos, 2008). Quatro grupos de quatro amostras para cada uma das superfícies avaliadas foram utilizados. Cada grupo foi retirado para o processamento conforme condições circunstanciais de agenda da rotina do laboratório e a utilização da capela de fluxo laminar, já que a manipulação da cultura demandava tempo. Contudo, os períodos entre cada observação estiveram próximos de quatro dias. O procedimento de fixação das células sobre os substratos deu-se pela retirada do meio de cultura, três enxágues com água deionizada desprezando o líquido sobrenadante, dois enxágües com 1 mL de metanol PA sobre as amostras por cinco minutos, desprezando-o e secagem em estufa seca a 37ºC.

**Determinação de FA**

As medidas de atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) foram realizadas nos meios de cultura durante o período de estímulo. Em cada troca de meio (48h), alíquotas com identificação, data e hora, eram armazenadas em tubos cônicos de 1,5 mL (Eppendorf®) e mantidas em congelador vertical doméstico (-10 ºC). Num primeiro ensaio, medidas durante a fase de proliferação indicaram não haver alteração na quantidade de FA no meio. Leituras de concentração existem no meio D-10 já que o soro fetal bovino contém FA de origem placentária. As medidas foram realizadas em equipamento automático de análise bioquímica sérica, marca Labtest® (mod. Labmax 240), da rotina de exames laboratoriais de bioquímica hepática do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário (Hovet) da FMVZ-USP. As alíquotas foram encaminhadas num único lote para a análise. A FA mantém-se estável nas condições de armazenagem utilizadas (Biosystems, 2010).

Para a verificação da incerteza associada nos valores medidos da atividade de FA pelo equipamento, foram inseridas, sequencialmente a cada 10 amostras, alíquota proveniente de uma mesma amostra de meio de cultura. A variância dos valores obtidos (3%) foi utilizada como indicativo da incerteza intrínseca do método proveniente do equipamento/ensaio bioquímico. A calibração do equipamento está em acordo com regulamentação nacional para utilização em Hospitais e Laboratórios de Análises Clínicas, sob supervisão do Ministério da Saúde. A observação temporal das séries amostrais indicou que a partir do décimo dia de atividade de diferenciação, a atividade de FA se estabiliza na cultura. Desta forma, valores médios da atividade de FA foram utilizados, juntamente com a variação observada. Os valores obtidos são os relativos aos encontrados no meio. Como mencionado, o meio de cultura nor-

malmente contém FA. As medidas relativas negativas indicam que parte da FA, proveniente do meio foi, de alguma forma, consumida pela cultura. Valores positivos indicam superávit de FA e esta diferença, certamente produzida pelas células.

**Determinação das Concentrações Cálcio e Fósforo**

Santos (2008), utilizando o mesmo arranjo PIXE utilizado neste trabalho, realizou medidas de quantificação de cálcio, com sucesso, diretamente nas placas de cultura da linhagem MG-63 irradiando em pressão atmosférica. No presente trabalho, ensaios preliminares confirmaram não haver necessidade, em baixas pressões, de preparo prévio e a possibilidade de serem realizados em câmara de vácuo. Tal arranjo possui maior controle da carga depositada e da energia do feixe. Nesta fase de ensaios, a quantidade de cálcio em placas de cultura fixadas na fase de proliferação esteve sempre abaixo do limite de detecção da técnica. Deste modo, acredita-se que as leituras de concentração de cálcio e fósforo observada na fase de diferenciação refletem concentrações da matriz mineral.

A técnica PIXE do LAMFI utiliza acelerador eletrostático tipo Tandem, horizontal (mod. 5SDH), da National Eletrostatic Corporation (NEC), que atinge tensões no terminal central de até 1,7 MV (LAMFI, 2010). Utilizou-se prótons acelerados e conduzidos através de elementos eletromagnéticos até a câmara de espalhamento onde colidem com as amostras, posicionadas a 45º em relação ao feixe, num porta-amostra linear com capacidade de 18 amostras. As amostras convencionais para este porta-amostra são discos porta-filtro de 25,4 mm de diâmetro utilizados para coleção de poluentes atmosféricos. Adaptadores metálicos foram confeccionados pelo autor para portar os discos de 12,7 mm de diâmetro. Os raios X produzidos são detectados em detector semicondutor, resfriados em nitrogênio líquido, tipo Si-Li, perpendicular à superfície da amostra (chamado de detector de baixa energia).

A eletrônica de aquisição consiste em amplificadores para os sinais eletrônicos e conversores analógicos digitais multicanais, comumente utilizados em instrumentação nuclear, que, após aquisição em computador tipo PC, são armazenados em arquivos de dados (espectro). Os espectros foram reduzidos em softwares gráficos de ajuste (AXIL: Van Espen), com ajustes dos picos relacionados aos raios X característicos K-α para cálcio e fósforo. As respectivas concentrações foram então determinadas com a utilização de fatores de resposta, dados

por curvas de calibração obtidas através de padrões conhecidos (Tabacniks, 1983) e com a quantidade total de íons incidentes (LAMFI, 2009).

Como a amostras eram espessas, a coleta da carga após o alvo, que fornece a quantidade de íons que colidem com a amostra, não foi possível. A solução foi utilizar um monitor do feixe incidente para indiretamente determinar a carga depositada. O aparato consiste numa folha de ouro interposta no feixe incidente, fina o suficiente para que não haja comprometimento da energia dos íons (2,4 MeV), mas que possa mostrar a intensidade de partículas proporcionalmente através de alguns prótons retroespalhados coletados (Aburaya, 2005). Deste modo, concomitantemente a cada irradiação, outro espectro foi armazenado com dados para a determinação da carga elétrica depositada, da ordem de nC. A calibração foi realizada com irradiações em fundo de copo de Faraday, que fornecem o valor da carga Q e os espectros "de carga", cujas integrais, colocadas contra os valores de carga direta fornecem uma correlação linear. Neste trabalho, a calibração da carga elétrica coletada em função da integral do pico espectral referente aos íons retroespalhados na folha de outro foi de 1,76(4) $10^{-3}$ nC/contagem.

**Imagens de Microscopia Eletrônica**

A série de eletromicrografias foi obtida no microscópio eletrônico de varredura, marca Philips®, modelo XL30, do Laboratório de Microscopia do Departamento de Metalurgia, da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo - EPUSP. As condições de operação foram: pressão $10^{-4}$ Torr; e feixe de elétrons com energia de 20 keV. O equipamento dispõe de detector de eletros secundários (convencional), de elétrons retroespalhados, e raios X para espectroscopia elementar. Os controles são todos digitais: magnificação, focalização do feixe eletrônico, assim como a obtenção da imagem. As amostras foram colocadas num porta-amostra, sobre adesivos condutores, em lotes de seis pastilhas. Artefatos de acúmulo de carga foram pouco evidentes, mesmo sobre o biofilme produzido pelas células. Nenhum tratamento de recobrimento com material condutor (ouro ou carbono) foi necessário. Foram realizados observações através de elétrons secundários (microscopia eletrônica convencional de superfície) e através de elétrons retroespalhados. A microscopia por elétrons secundários permitiu observar o biofilme orgânico mineral formado pela célula. A microscopia por elétrons retroespalhados permitiu distinguir nas imagens, a homogeneidade da cobertura do biofilme, pois é sensível à diferença, em número atômico, entre os elementos do substrato (Ti e O) e da matriz secretada (Ca, P, H e O). A presença do biofilme sobre a superfície, além da observação da

atividade de diferenciação, é indicativo de osteointegração, isto é, o preenchimento da superfície com células aderidas, predispõe a formação de tecido ósseo maduro (Dekker, 2005; Pearce, 2007).

## RESULTADOS E ANÁLISE

Todas as afirmações são baseadas em estatística com nível de significância de 5%.

### Superfície da Placa de Cultura

Os ângulos de contato obtidos da placa de cultura (PC) confirmam a característica de hidrofilicidade apresentado no catálogo do fabricante (Corning®, 2010). O valor de 55,6(5)º[8] obtido das placas de cultura utilizadas indica uma superfície hidrofílica. Ou ainda, do termo na língua inglesa *wettability* traduzido livremente, uma superfície com alta molhabilidade. O ângulo de contato medido, utilizando-se glicerina, foi de 71,2(5)º (Figura 15) sugerindo que a superfície possui mais componentes interagentes com líquidos polares, isto é, a característica dependente da topografia é menos presente. O método de Fox-Zisman indica uma energia livre de superfície de 91(5) mJ/m$^2$.

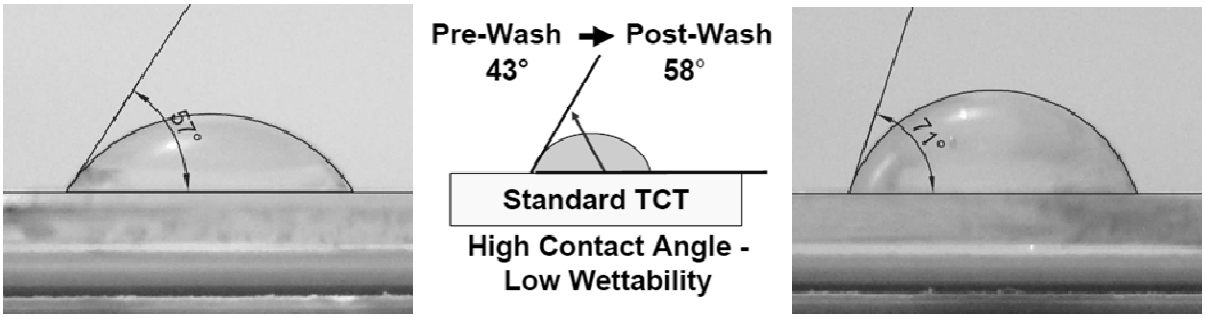



Figura 15: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies da placa de cultura. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina. O valor de 57º para a água está de acordo com o apresentado no catálogo do fabricante (ao centro). Retirado de Corning® (2010).

Os resultados nas concentrações relativas de FA, presente no meio de cultura, mostram que há um déficit sistemático da enzima, durante o período de observação da cultura. O valor médio encontrado foi de -1,60(23) U/L. A possibilidade de estar havendo degradação da FA devido às condições da estufa de cultura foi descartada com medidas de uma alíquota mantida

[8] Notação de incerteza utilizada neste trabalho: o valor entre parênteses indica a variação da última casa. A notação 55,6(5) reflete o valor de 55,6 com incerteza (desvio padrão) de 0,5. Quando a incerteza refletir valores mais significativos a notação dá-se da seguinte forma, por exemplo, para a notação 10,2(1,3), o valor encontrado foi de 10,2 com incerteza de 1,3.

por 96h nas mesmas condições de trabalho das culturas. Não foi observada alteração estatística das concentrações de FA. Os resultados mostram que FA presente no meio de cultura foi consumida.

As concentrações determinadas por PIXE para cálcio e fósforo, foram [Ca] = 2,89(9) $\mu g/cm^2$, [P] = 4,20(13) $\mu g/cm^2$, respectivamente. A relação entre a concentração de cálcio e fósforo foi determinada em [Ca]/[P] = 0,70(3). Considerando os fosfatos já identificados por Santos (2008) como produtos de mineralização desta linhagem celular, o possível candidato é o ortofosfato de cálcio, cuja relação em massa é de 0,65.

A energia livre de superfície do filme formado pela cultura celular foi determinada a partir da análise do ângulo de contato diretamente sobre o biofilme formado pelas células. Para o filme encontrado em PC o valor determinado foi de 78(4) $mJ/m^2$, sendo os ângulos de contato determinados para a água e para a glicerina, respectivamente, 39,6(5)º e 70,4(5)º (Figura 16).

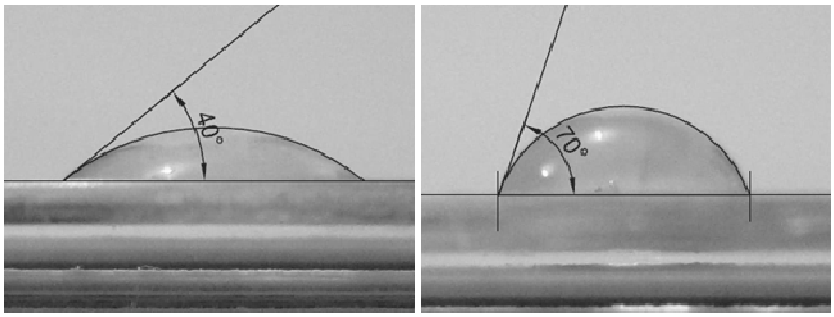



Figura 16: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies da placa de cultura sobre o biofilme produzido pela cultura celular. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina.

**Superfície Comercial de Titânio**

Nos discos de titânio (TI), cuja superfície é, de fato, óxido de titânio, a análise do ângulo de contato indica estar no limiar de uma superfície considerada hidrofílica ($\theta < 60º$). O valor medido foi de 69,6(5)º para a água, e para a glicerina 80,8(5)º (Figura 17). A energia livre de superfície foi determinada de 104(7) $mJ/m^2$. Estatisticamente, a superfície TI possui energia livre de superfície diferente e maior que o encontrado em PC. Os ângulos obtidos, para líquidos polares (água) e apolares (glicerina), indicam que a superfície TI, para ambos os

componentes da interação superficial (polar e apolar) com o líquido, são maiores que os encontrados em PC. A própria energia livre reflete a diminuição da molhabilidade.

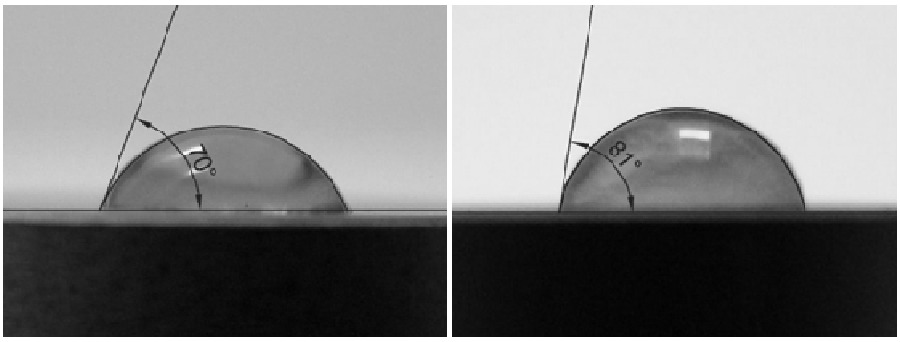



Figura 17: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies de TiO2 não modificadas. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina.

Como na superfície PC, as concentrações relativas de FA, presente no meio de cultura, mostram um déficit da enzima presente. O valor médio encontrado foi de -1,73(28) U/L, com FA, que estava presente no meio de cultura, consumida de alguma forma. Esta superfície e a PC possuem valores semelhantes de concentração da enzima no meio de cultura.

Na superfície TI foram encontrados: [Ca] = 1,75(9) $\mu g/cm^2$; [P] = 2,81(10) $\mu g/cm^2$. A relação entre a concentração de cálcio e fósforo foi determinada em [Ca]/[P] = 0,65(4). Da mesma forma que na superfície PC, a relação em massa de cálcio e fósforo do ortofosfato de cálcio pode ser evidenciada. Estatisticamente, [Ca]/[P] desta superfície e de PC apresentaram valores semelhantes. Contudo, a quantidade de material mineralizado encontrado foi aproximadamente 2/3 do encontrado em PC.

Na eletromicrografia por elétrons retroespalhados (como na Figura 18, esquerda) observou-se que nas superfícies TI, o biofilme (matriz mineral) não apresentava cobertura homogênea. Apresentava núcleos de formação de nódulos ósseos (regiões escuras), sendo possível observar a própria superfície (regiões claras, Figura 18, esquerda). Assemelha-se ao que é observado a olho desarmado nas placas de cultura, após coloração específica para cálcio com vermelho de alizarina (como na Figura 18, centro). Na eletromicrografia convencional (elétrons secundários) podem ser observados, em aumento maior sobre a matriz secretada, padrões de fissuras. Tratam-se de artefatos que podem ter sido produzidos, no processo de fixação das células no substrato, devido à desidratação.

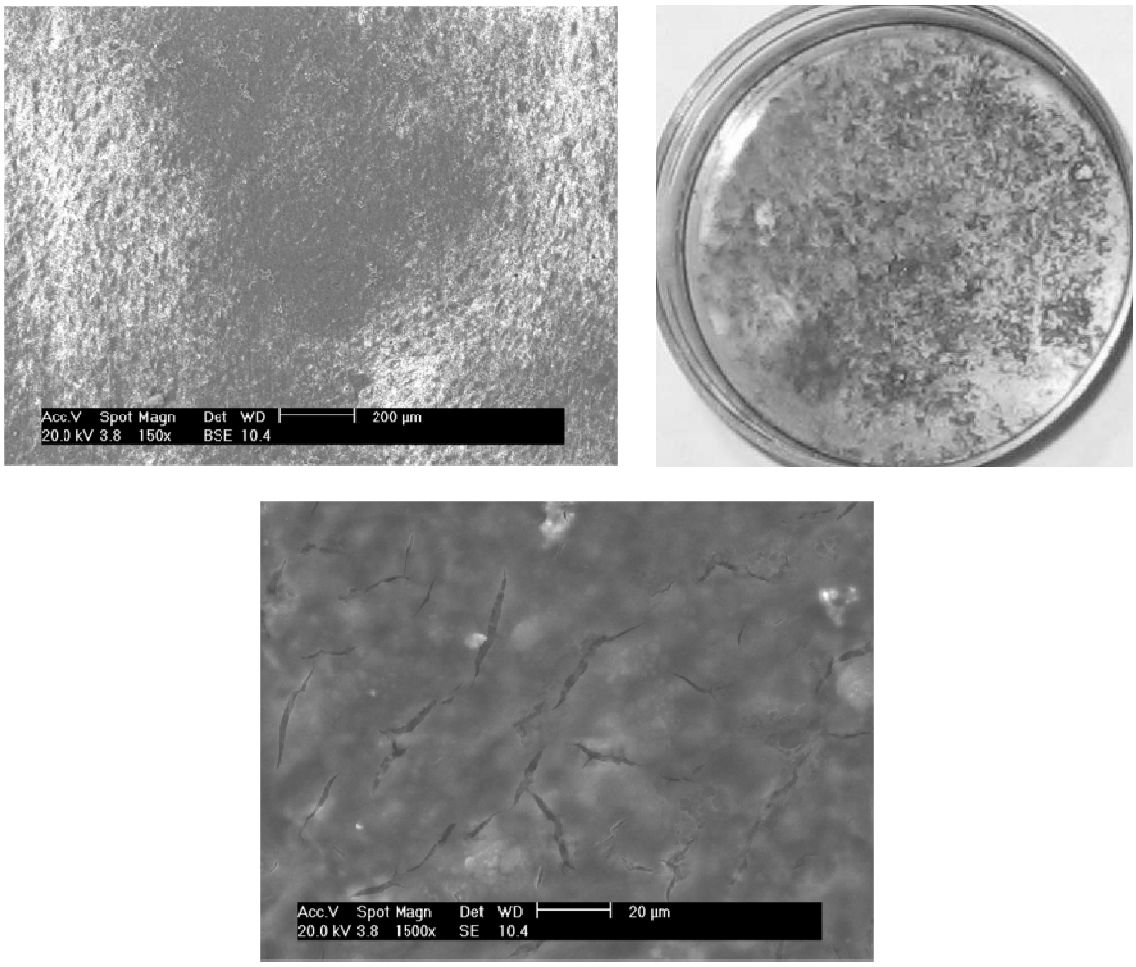



Figura 18: A imagem superior à esquerda corresponde à eletromicrografia de elétrons retroespalhados da superfície TI. Regiões claras provêm da superfície do metal, regiões escuras, da matriz mineral formada; à direita, observação em olho desarmado de cultura sobre PC. Coloração por vermelho de alizarina. Retirado de Santos (2008); inferior à direita, eletromicrografia de elétrons secundários da superfície TI. As fissuras apresentadas são artefatos da fixação da cultura sobre a superfície.

A quantidade de material mineral sobre a superfície, determinada por PIXE, vem de um spot de um feixe com dois milímetros de diâmetro. Ou seja, o valor determinado é uma média da área deste feixe. Assim, a quantidade de material mineralizado nas regiões escuras, isto é a densidade superficial, é ainda maior que o apresentado.

A energia livre de superfície do filme formado pelas células em TI foi determinada e seu valor 80(4) $mJ/m^2$ é estatisticamente semelhante ao encontrado no filme sobre PC, mesmo com seus ângulos de contato apresentando valores diferentes. Para a água e para a glicerina, respectivamente, 52,4(5)º e 80,8(5)º.

**Superfície Modificada por Implantação de Fósforo**

O ângulo de contato na superfície de titânio implantada com fósforo (PT), para a água, possui o valor médio de 128,4(5)º, e para a glicerina, 125,5(5)º. Nitidamente hidrofóbica ($\theta > 120º$), com energia livre de superfície não podendo ser determinada pelo método de Fox-Zisman, devido à proximidade dos ângulos. A molhabilidade neste caso é pior que nas duas superfícies já expostas. A situação demonstra que o comportamento de líquidos polares e apolares ao "molhar" as superfícies é semelhante. As interações devido à topografia são mais evidentes que as mediadas por interação eletrostática.

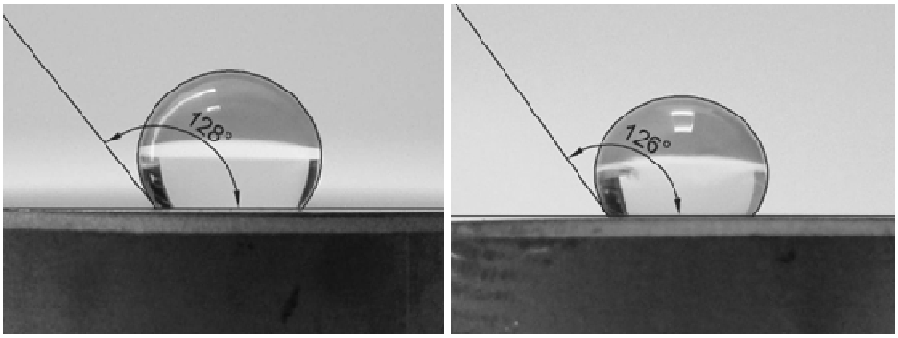



Figura 19: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies de $TiO_2$ modificadas por implantação de fósforo. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina.

A atividade de FA no meio, em PT, foi de 3,48(24) U/L. A atividade de FA encontrada nesta superfície sugere favorecimento à osteintegração frente às outras já apresentadas, dada a alta expressão da FA (atividade celular). Como em TI, também foi observada flutuação da concentração da enzima ao longo do tempo.

A superfície PT apresentou concentrações de cálcio e fósforo dados pelos valores: [Ca] = 1,17(7) $\mu g/cm^2$ e [P] = 2,60(10) $\mu g/cm^2$. A relação em massa de cálcio/fósforo obtido foi [Ca]/[P] = 0,46(3) que indica haver fósforo não ligados ao cálcio. A quantidade de material mineralizado foi estatisticamente diferente ao encontrado em TI. A relação [Ca]/[P] indica composto mineral com proporções menores de cálcio, comparados com os apresentados por PC e TI.

Na superfície PT, a eletromicrografia por elétrons retroespalhados (como na Figura 20, esquerda) revela uma superfície com uma cobertura (matriz mineralizada) mais homogênea

que a observada em TI. Na eletromicrografia convencional (como na Figura 20, direita) podem ser observados, em aumento maior sobre a matriz secretada, padrões de fissuras diferentes que as observadas em TI. Estas descontinuidades do filme estão possivelmente ligadas ao processo de desidratação e pode revelar a fragilidade da cobertura mineralizada, traduzida, nesta superfície, por fissuras mais alongadas, com bordos mais irregulares, formando uma estrutura com aspecto quebradiço. Tal observação vem ao encontro da quantidade de material mineral, encontrado nesta superfície, menor que a observada em TI. E, além de haver menos material, está mais diluído sobre a superfície (menor densidade superficial), já que apresenta cobertura mais homogênea (maior área). Este fato pode indicar um filme mais fino e frágil, e consequentemente mais sensível ao processo de fixação das células na superfície (desidratação).

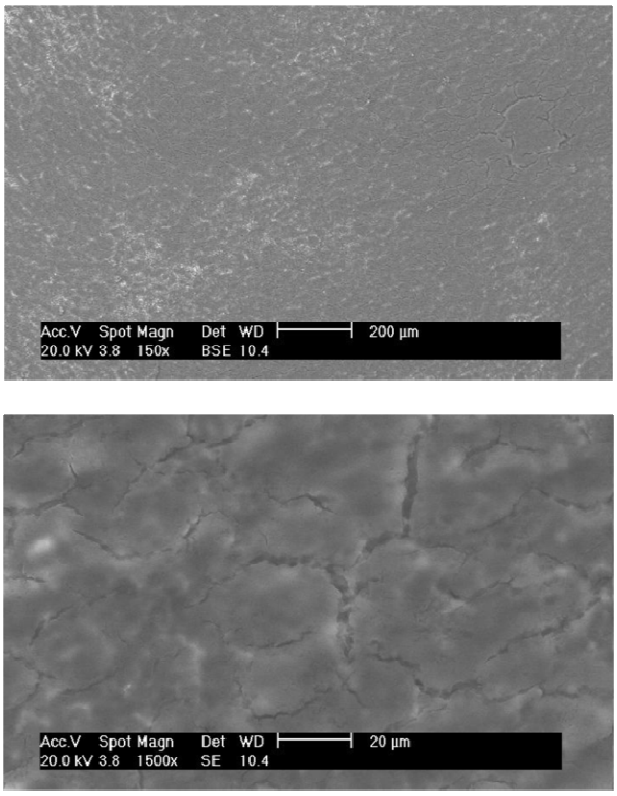



Figura 20: A imagem superior corresponde à eletromicrografia de elétrons retroespalhados da superfície PT. Regiões claras provêm da superfície do metal, regiões escuras, da matriz mineral formada. A inferior, eletromicrografia de elétrons secundários da superfície PT. As fissuras apresentadas são artefatos da fixação da cultura sobre a superfície.

Na eletromicrografia de elétrons retroespalhados pode se notar cobertura celular mais homogênea e contínua na superfície PT. Lembrando que há apenas uma monocamada de células e que estas pertencem à mesma linhagem celular, espera-se que a quantidade de células nesta superfície seja maior que a encontrada em TI, pela amplitude da cobertura mineral. Tal

observação, relacionada com a atividade de FA mais alta, pode conter uma correlação positiva entre o número de células, secretando FA, com sua concentração. A relação de material mineral por célula, comparado com a apresentada pela superfície TI, é menor, isto é, há menor quantidade de cálcio e fósforo, numa área maior de cobertura celular. Ou ainda, que a superfície TI apresentou maior concentração de cálcio e fósforo em menor área de cobertura celular. Poderia explicar a alta atividade de FA em PT com células secretando FA com baixa velocidade de formação de matriz; e em TI, menos células secretando FA, com alta velocidade de formação de matriz, consumindo FA além do secretado.

A energia livre de superfície do filme formado pelas células em PT foi determinada e seu valor 80(4) $mJ/m^2$ é ainda semelhante ao encontrado no filme sobre PC e TI, mostrando mesma característica de molhabilidade . Os ângulos encontrados para a água e para a glicerina, respectivamente, 49,6(5)º e 77,2(5)º, estão próximos aos observados em TI.

**Superfície Modificada por Implantação de Flúor e Boro**

Na superfície de titânio implantada com flúor e boro (BFT), os valores encontrados para os ângulos de contato foram 115,4(5)º para a água deionizada e 116,0(5)º para a glicerina. Para a característica de hidrofilicidade, a superfície se encontra na transição do considerado hidrofóbico clássico. Contudo, pode-se dizer que os valores demonstram também, como em PT, que a superfície é hidrofóbica. E ainda, comportamento semelhante na interação com líquidos polares e apolares.

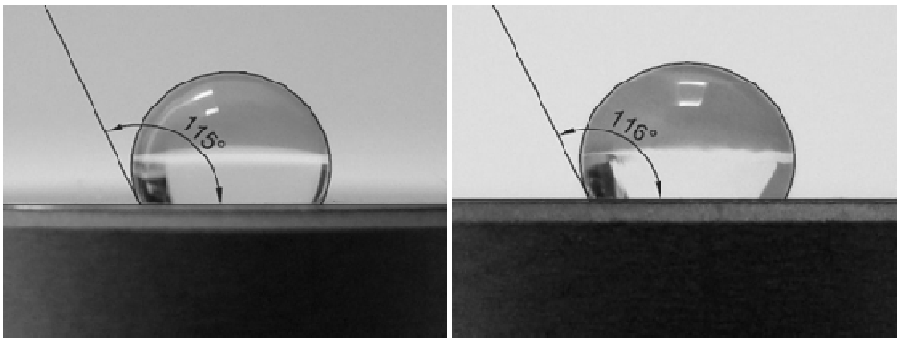
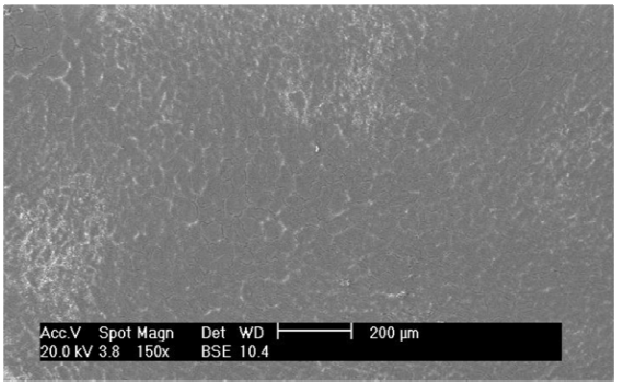



Figura 21: Ângulos de contato típicos encontrados nas superfícies de TiO2 modificadas por implantação de flúor e boro. À esquerda, o líquido é água deionizada. À direita, glicerina.

Na superfície BFT, a atividade de FA é estatisticamente semelhante ao encontrado em PT. O valor de 3,38(15) obtido reflete que o meio de cultura contém FA produzida pela cultura celular. Aplicando-se ANOVA (*Analysis of Variance*) pareada com as superfícies anteriormente apresentadas (PC, TI e PT), há indicação de semelhança apenas com a concentração encontrada em PT, e pode ser considerada estatisticamente diferente de PC e TI.

Em BFT, a concentração de cálcio foi determinada em [Ca] = 1,08(5) $\mu g/cm^2$, e a concentração de fósforo em [P] = 2,13(8) $\mu g/cm^2$. Tais valores indicam uma relação de cálcio/fósforo [Ca]/[P] = 0,52(3). Valor estatisticamente semelhante ao encontrado em PT. A quantidade de material mineralizado é estatisticamente semelhante também. Chama a atenção que as superfícies implantadas apresentaram sistematicamente [Ca]/[P] menores. Um indicativo da presença de fósforo não ligado ao cálcio.

A eletromicrografia por elétrons retroespalhados (como na Figura 22, esquerda) revela que a superfície BFT é muito semelhante a PT, com uma cobertura homogênea da matriz mineralizada. A eletromicrografia convencional (Figura 22) mostra padrões de fissuras também semelhantes às encontradas em PT. Assim como em PT, baixa mineralização em maior área (mais homogêneo) permite considerar um filme mais fino, compatível com a fragilidade revelada pelos artefatos do processo de fixação.



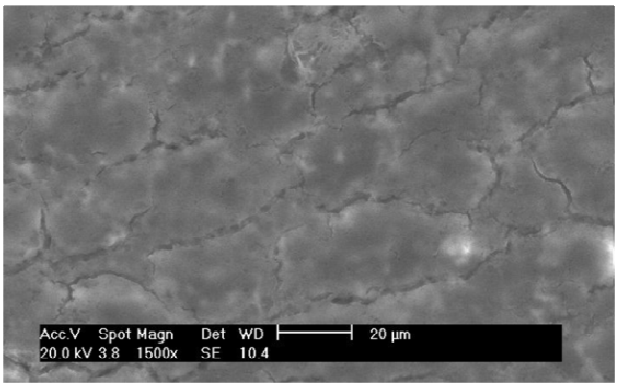



Figura 22: A imagem superior corresponde à eletromicrografia de elétrons retroespalhados da superfície BFT. Regiões claras provêm da superfície do metal, regiões escuras, da matriz mineral formada. A inferior, eletromicrografia de elétrons secundários da superfície BFT. As fissuras apresentadas são artefatos da fixação da cultura sobre a superfície.

A energia livre de superfície do filme formado pelas células em BFT foi determinada e seu valor 87(6) mJ/m$^2$ é também semelhante ao encontrado no filme sobre PC e TI e PT. Ou seja, quanto à energia livre de superfície, as culturas de células sobre as quatro superfícies estudadas produzem biofilmes semelhantes. Os ângulos encontrados para a água e para a glicerina de, respectivamente, 58,7(5)º e 77,9(5)º mostram que o filme produzido sobre BFT é menos hidrofílico que nas demais superfícies.

**Atividade Celular versus Mineralização**

Na Tabela 5 encontra-se a consolidação dos valores obtidos oriundos do ensaio *in vitro* das superfícies estudadas. Na Tabela 6, os valores da análise de ângulo de contato encontrados na superfície das amostras e no biofilme produzido pelas células em cultura.

A superfície da placa de cultura e do titânio (PC e TI) são semelhantes na atividade de FA e na relação de [Ca]/[P] encontrados. Da análise do ângulo de contato verificou-se que as energias livres de superfície em ambas são semelhantes antes da cultura celular e no biofilme produzido pelas células. As energias livres de superfície de PT e BFT antes da cultura celular não foram determinadas devido à pequena diferença entre os ângulos medidos. A análise de ângulo de contato sobre o biofilme produzido indicou que apenas BFT não possuía energia livre de superfície semelhante à encontrada em PC.

Tabela 5: Valores consolidados referentes aos obtidos na cultura celular nas quatro superfícies estudadas.

| Superfícies | Cultura Celular | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **ΔFA** | **Ca** | **P** | **Ca/P** | **Ca+P** | **MEV** |
| | [U/L] | µg/cm$^2$ | µg/cm$^2$ | - | µg/cm$^2$ | δ céls.[1] |
| **PC** | -1,6(2) | 2,9(1) | 4,2(1) | 0,70(3) | 7,1(2) | [2] |
| **TI** | -1,7(3) | 1,8(1) | 2,8(1) | 0,65(4) | 4,6(1) | + |
| **PT** | 3,5(2) | 1,2(1) | 2,6(1) | 0,46(3) | 3,8(1) | **++** |
| **BFT** | 3,4(2) | 1,1(1) | 2,1(1) | 0,52(3) | 3,2(1) | **++** |

**(1)** Indicação de maior densidade superficial de células. **(2)** não foi obtida imagem em PC

Tabela 6: Valores consolidados referentes aos obtidos na análise do ângulo de contato nas quatro superfícies estudadas.

| Superfícies | ACC - Superfície | | | ACC – Biofilme | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Água** | **Glic.** [1] | $\gamma_{sv}$ [2] | **Água** | **Glic.** | $\gamma_{sv}$ |
| | graus | graus | mJ/m$^2$ | graus | graus | mJ/m$^2$ |
| **PC** | 55,6(5) | 71,2(5) | 91(5) | 39,6(5) | 70,4(5) | 78(4) |
| **TI** | 69,6(5) | 80,8(5) | 104(7) | 52,4(5) | 80,8(5) | 80(4) |
| **PT** | 128,4(5) | 125,5(5) | - | 49,6(5) | 77,2(5) | 80(4) |
| **BFT** | 115,4(5) | 116,0(5) | - | 58,7(5) | 77,9(5) | 87(7) |

**(1)** Glicerina. **(2)** Energia Livre de Superfície

A superfície PT possui energia livre de superfície do biofilme semelhante ao encontrado em TI, além da mesma concentração de fósforo. Mas, as semelhanças de PT são maiores com BFT. As concentrações de FA, de cálcio, a relação em massa de cálcio e fósforo e a densidade de células sugerida pela eletromicrografia são semelhantes entre PT e BFT. As energias livres da superfície dos biofilmes formados valores próximos em todos os substratos.

Os valores da série temporal permitiram observar que há uma flutuação em todas as medidas e que não podem ser explicadas pela incerteza das técnicas utilizadas. Uma possível variação biológica foi considerada como elemento gerador da flutuação. A atividade celular, vinculado à expressão da FA tem picos e vales durante o período experimental. Talvez por variações na condição da estufa ou a manipulação das culturas, o ambiente se modifica, aumentando ou diminuindo a atividade osteoblástica. Uma relação clara existe entre a atividade

de FA e a quantidade de fósforo medida, nas observações ao longo do tempo (Figura 23). Não foi possível estabelecer um índice de correlação entre todas os substratos, já que os grupos foram retirados em dias alternados (devido à restrição nos períodos experimentais) e não puderam ser pareados. As outras variáveis possuíram comportamentos semelhantes. Da mesma forma que não puderam ser pareados, não foram estabelecidas relações entre as séries temporais destes.

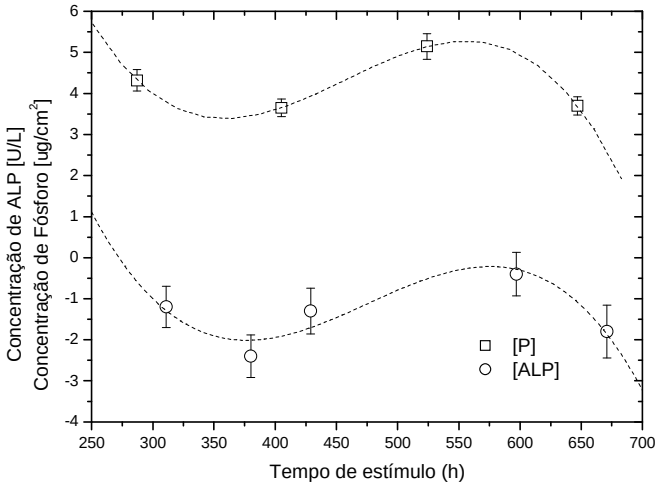



Figura 23: Exemplo de variações observadas na cultura em função do tempo. Atividade de FA e fósforo seguiram o mesmo comportamento na placa de cultura. Linhas interrompidas ilustrativas.

Na tentativa de buscar entender a mineralização frente à atividade celular, foram estabelecidas relações de cálcio e atividade de FA (Figura 24, esquerda). E a razão em massa entre, a quantidade de cálcio e a quantidade de fósforo, e atividade de FA. A concentração de fósforo segue o mesmo comportamento observado para a de cálcio. A visualização desta forma permite mostrar que a mineralização pode ser qualitativamente agrupado como: baixa mineralização "-" (PT e BFT), média mineralização "0" (TI) e alta mineralização "**+**" (PC). A atividade de FA enquadra-se qualitativamente, em baixa concentração "-" (PC e TI), e alta concentração "**+**" (PT e BFT). A composição estequiométrica da matriz permite dividir em dois grupos: baixa relação "-" (PT e BFT) e alta relação "**+**" [Ca]/[P] (PC e TI). Tais informações sugerem o exposto no Quadro 3.

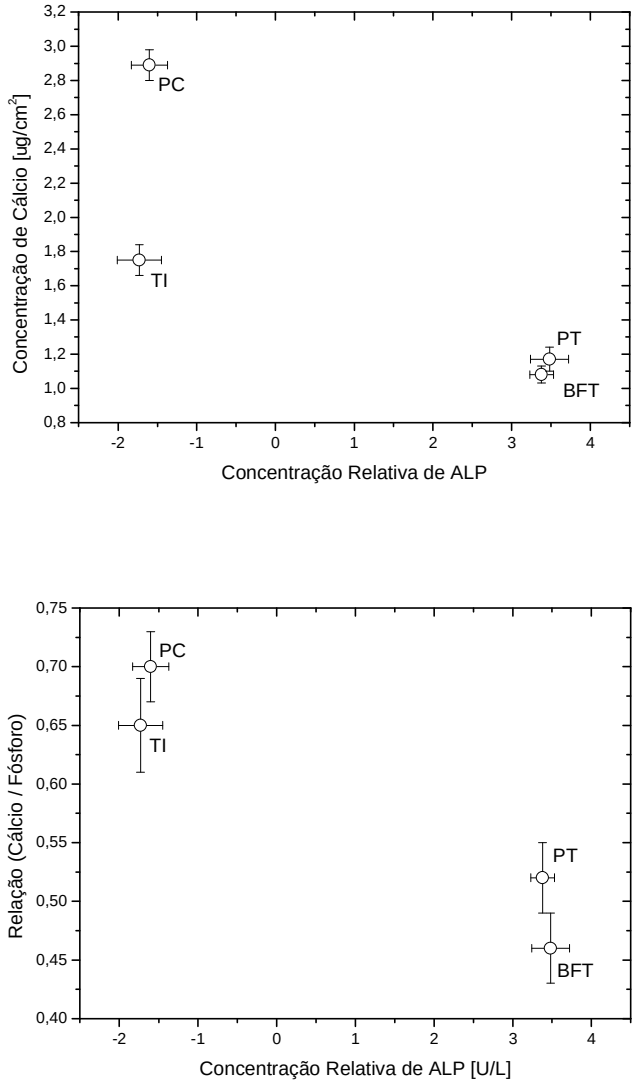



Figura 24: O gráfico superior corresponde à relação de quantidade de cálcio e atividade de FA. O inferior, a relação entre a razão em massa, entre a quantidade de cálcio e a quantidade de fósforo, e atividade de FA.

Quadro 3: Classificação qualitativa das observações e indicações de atividade de mineralização; e de atividade de FA.

| **Superfícies** | **Mineralização** | | | | **[FA]** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **[Ca] ou [P]** | **[Ca]/[P]** | **Homog.(1)** | **Espessura** | |
| PC | **+** | **+** | | | - |
| TI | 0 | **+** | - | **+** | - |
| PT | - | - | **+** | - | **+** |

| Superfícies | Mineralização | | | | [FA] |
|---|---|---|---|---|---|
| | [Ca] ou [P] | [Ca]/[P] | Homog.(1) | Espessura | |
| BFT | - | - | + | - | + |

(1) Homogeneidade do biofilme mineralizado.

A atividade de FA mostra-se relacionada com a relação [Ca]/[P], isto é, a formação do complexo cálcio mais fósforo implicou em níveis baixos de FA no meio de cultura, como os encontrados no grupo PC e TI. De tal maneira que, observaram-se concentrações de FA superiores onde há mais fósforo que cálcio, isto é, onde a relação [Ca]/[P] foi menor, grupos PT e BFT.

Os ângulos de contato (cossenos) para a água e para a glicerina, antes da cultura celular, em relação às concentrações de FA, encontradas ao longo do período experimental da cultura celular, estão apresentados na Figura 25. Os cossenos dos ângulos de contato estão associados com a componente dispersiva da interação líquido-sólido. Valores superiores indicam superfícies com maior molhabilidade. Estão agrupados em dois extremos: inicialmente hidrofílicas e “molháveis” com alto consumo de FA (concentrações negativas encontradas no meio de cultura); hidrofóbicas e pouco “molháveis” com acúmulo de FA no meio de cultura (possível aumento da atividade celular).

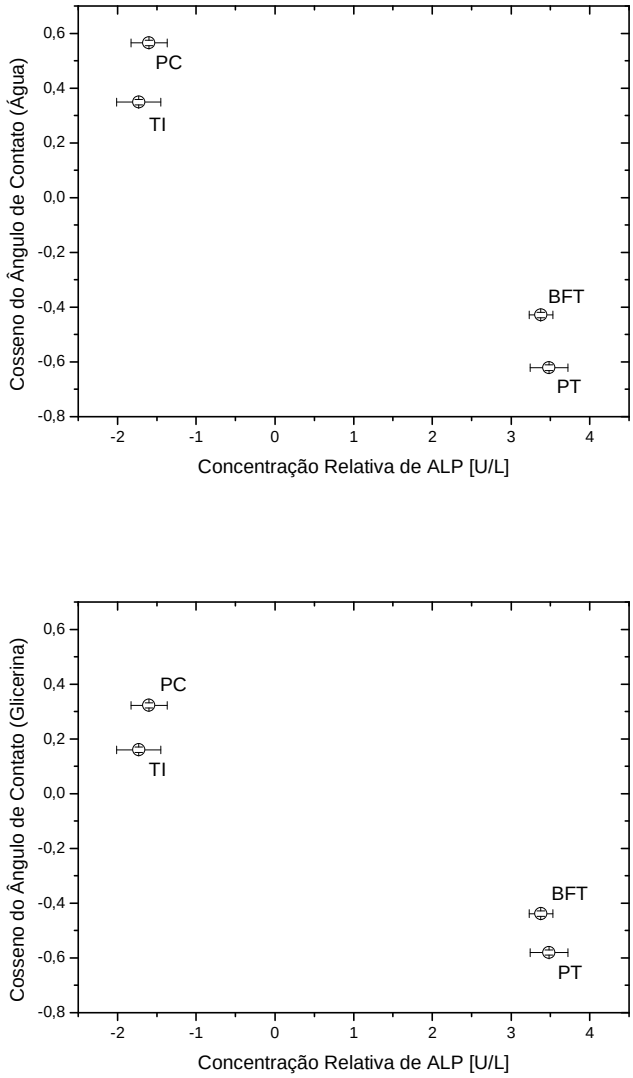



Figura 25: O gráfico superior corresponde à relação do ângulo de contato com água e atividade de FA. O inferior, a relação do ângulo de contato com glicerina e atividade de FA. Ângulos obtidos na superfície das amostras antes da cultura celular.

O caráter de hidrofilicidade em relação a osteointegração tem sido explorado como argumento principal para a modificação superficial de implantes dentários (Buser, 2004). E tem sido exposto em materiais publicitários de grandes empresas internacionais (Straumann, 2010). Nestes casos, as colocações estiveram relacionadas a uma maior adsorção de proteínas (Seibl et al., 2005) e aumento da diferenciação celular (Zhao et al., 2005) e proliferação (Rausch et al., 2008). As observações em TI não demonstram alta proliferação celular quando comparado com PT ou BFT, mas uma cobertura mineral, produto da atividade celular, mais significativa. Talvez o mecanismo esteja na nucleação para a mineralização, iniciada pela

adsorção de biomoléculas à superfície. Contudo, frente à proliferação celular, o caráter de hidrofilicidade não inibiu que toda a superfície de PT e BFT estivessem cobertas com células osteoblásticas, secretando FA e, com menor velocidade, formando matriz extracelular mineral.

De outro lado, considera-se que coberturas celulares mais organizadas, mesmo com menor mineralização, comparadas às que garantem mais matriz inorgânica, possuem melhor resposta em ensaios *in vivo*, com a observação de maior área de contato ósseo tecidual. E que o estágio inicial de apresentação da superfície, mais homogêneo, mesmo com menor mineralização inicial, seja mais indicado para a engenharia de implantes (Dekker, 2005). Superfícies hidrofílicas são cobertas com células mais rapidamente, apresentando centros de nucleação mineral em período anterior que nas superfícies hidrofóbicas. Nas superfícies hidrofóbicas, pela menor velocidade para a formação dos centros de nucleação mineral, há maior área de interação (maior número de células) antes da fase de formação da matriz mineral.

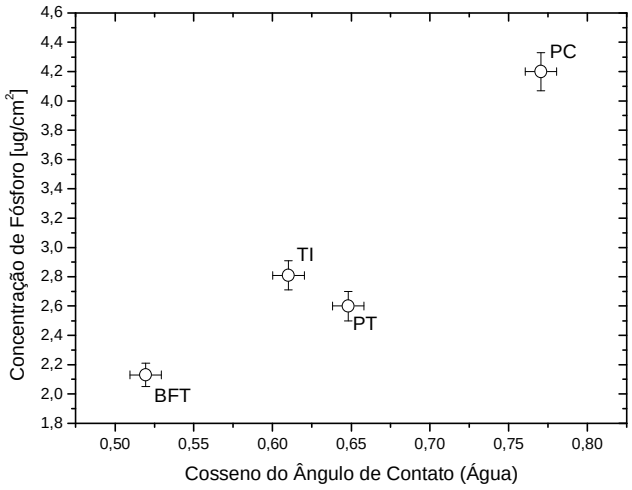



Figura 26: Relação entre a concentração de fósforo no biofilme e o ângulo de contato para a água.

Outra relação encontrada foi da concentração de fósforo, em relação ao ângulo de contato da água sobre o biofilme produzido pela cultura celular. Observa-se um comportamento linear quando colocadas as superfícies num mesmo gráfico (Figura 26). O mesmo não vale para as concentrações de cálcio ou a relação cálcio/fósforo.

## DISCUSSÃO

A metodologia de investigação *in vitro* demanda acompanhamento diário da cultura celular (observação, troca de meio), o preparo antecipado de alguns reagentes (fracionamento, meios de cultura), o preparo imediato de outros (antibióticos, ativadores), e o cuidado constante para evitar contaminações bacterianas ou fúngicas. As etapas iniciais de replicação da cultura demandam tempo para estabelecer número de células suficientes para todo o período experimental de investigação. Neste trabalho foram seis períodos iniciais de três meses, para acertar a rotina do laboratório e realizar investigações sobre a metodologia a ser utilizada. Três períodos experimentais de estudo do padrão de proliferação celular foram perdidos: em função de falta de energia elétrica (imprevisível); contaminação por bactérias nas garrafas de cultura (erro de manipulação); contaminação por fungo (estufa contaminada). Uma vez estabelecidas as condições de trabalho, a quantidade de células iniciais utilizada pode ser alcançada, juntamente com a quantidade de alíquotas criopreservadas (suspensão de atividade) para a manutenção segura da linhagem celular no laboratório. O ensaio realizado em amostras manipuladas simultaneamente (96 para quatro superfícies) permitiu definir os parâmetros temporais e os cuidados de manipulação da cultura na fase proliferativa e determinação de erros associados em cada etapa da diferenciação celular.

Como descrito por vários autores citados, a modificação de materiais (engenharia de biomateriais) precisa de uma linha investigativa de crescimento celular como pesquisa de base para citotoxicidade. Colocam-se como características destes ensaios: praticidade, padronização, parametrização e definição das observações de avaliação de biocompatibilidade do material (citotoxicidade). Os estudos *in vitro* são anteriores aos estudos *in vivo*. Em nenhum dos passos dados neste trabalho, há a identificação de falhas no processo de interação entre o material de implante comercial (TI) e células fibroblásticas. Falhas significariam citotoxicidade da superfície candidata caso os produtos da degradação da superfície frente às reações químicas em meio fisiológico, causassem injúria celular com alterações no metabolismo celular. Neste caso, não foram encontrados evidências dessas falhas entre as superfícies estudadas e as células da linhagem MG-63. Observação após sete dias e outra aos quatorze dias após a estimulação para a diferenciação celular permitem avaliar se houve incremento da atividade osteoblástica com medidas da concentração de cálcio e fósforo na matriz mineral produzida (PIXE) ou com a determinação da atividade de FA no meio de cultura.

As flutuações observadas em todo o tempo experimental, seja da atividade de FA no meio de cultura, seja da quantidade de fósforo no biofilme, podem estar associadas à sensibilidade das medidas frente às condições multiusuário da estufa de cultura, que alteram as condições de manutenção das células. O período de 15 dias destas oscilações é compatível com algumas rotinas do laboratório. A investigação destas variações em ambiente ainda mais controlado ou reconhecer as condições experimentais com o registro contínuo das condições do ensaio, por exemplo, através da aquisição digital das leituras dos parâmetros da estufa ($\%CO_2$, umidade, temperatura) poderia estabelecer correlações. A quantidade de fósforo, sensível às condições físicas de manutenção da cultura pode estar associada ao fósforo intracelular e pode explicar a baixa relação [Ca]/[P] encontrada em PT e BFT, já que as medidas foram realizadas sobre a matriz mineralizada e todas as células "aprisionadas". A digestão dos componentes orgânicos com a solubilização dos compostos fosforados poderia revelar a real contribuição do fósforo medido para a matriz extracelular de cristais de fosfato e apatitas.

A linhagem MG-63 permite estabelecer relações com demais pesquisadores, já que consistem em linhagem padronizada e utilizada nas pesquisas onde a interação com o tecido ósseo é investigada. As medidas de atividade de FA, propostas neste trabalho seguem normas laboratoriais cujo controle de qualidade permitiu avaliar de forma adequada valores de FA no meio de cultura e estabelecer um importante protocolo de avaliação de sua atividade. Popular os gráficos com informações de outros biomateriais, e a determinação de FA no meio de cultura poderiam permitir entender como estes interferem na produção/consumo de FA. O consumo de FA parece estar ligado à utilização do fósforo para o depósito de fosfato de cálcio. Medidas da concentração de cálcio e fósforo, ângulo de contato e atividade de FA poderiam ser úteis no direcionamento de pesquisas de novos materiais, como sinalizador de condições mais favoráveis de crescimento celular *in vitro* e *in vivo*.

A análise do ângulo de contato foi simplificada pelo micropipetador automatizado que garante alta reprodutibilidade da gota na superfície. O auxílio do computador para ajustar o perfil da gota, com a imediata determinação do segmento de reta tangente no ponto de contato diminui as influências do usuário no ajuste dos goniômetros convencionais que utilizam acurácia pessoal e visual para a determinação do ângulo de contato. A adsorção de proteínas poderia ser verificada através da análise do ângulo de contato com a utilização de soluções que mimetizem a apresentação da superfície às células. Uma vez estabelecida condições experimentais deste requisito básico, a primeira etapa da cultura celular (fixação) poderia ser avalia-

da sem a necessidade de recorrer ao ensaio *in vitro* e sua estrutura, minimizando tempo e recursos.

A observação da formação de um biofilme, produto de secreção da cultura celular, a sua caracterização pelo ângulo de contato, a visualização de homogeneidade pela eletromicrografia por elétrons retroespalhados e o indicativo de espessura, pelos padrões de fissura decorrentes do processo de fixação das células e de sua matriz mineral, permitem qualitativamente comparar a fixação, proliferação e a diferenciação celular sobre os biomateriais candidatos. As observações de biocompatibilidade, sobre a superfície comercial de implantes, reconhecidamente biocompatível, indo ao encontro de alguns resultados de outra superfície biocompatível (placas de cultura), são evidências do sucesso dos ensaios *in vitro* realizados neste estudo. Assim, o ensaio *in vitro* sobre as superfícies dos biomateriais conhecidos permitiu estabelecer observações que demonstram viabilidade celular. Dentre eles, a presença de cálcio e fósforo e as medidas de atividade de FA, refletem a diferenciação osteoblástica das células fibroblásticas. A afirmativa se dá pela ausência de sinal de cálcio ou fósforo na superfície da cultura até o momento anterior à colocação, no meio de cultura, do sinalizador de diferenciação. Variação da atividade de FA, presente no meio de cultura, também não foi observada até o início da diferenciação. A modificação do titânio por implantação de $BF_2$ e P, que embutiu forte caráter hidrofóbico às superfícies, teve respostas celulares, dadas pela presença de matriz mineral e FA no meio de cultura, que permitem dizer não haver rejeição da superfície pela cultura, isto é, as células seguiram o caminho de diferenciação, com aptidão específica de criar filmes celulares contínuos e semelhantes às encontradas em PC e TI.

A concentração superficial de íons implantados na superfície em relação aos constituintes do substrato (titânio e oxigênio), não permite explicar as proximidades das características observadas no ensaio *in vitro* entre as superfícies modificadas, PT e BFT. A diferença de valência deveria estabelecer uma diferença experimental mais significativa já que as interações eletrostáticas ocorrem em sentidos contrários. Mesmo assim, pode ocorrer que os sítios de ancoragem eletrostática sejam diferentes em ambas as superfícies, com resposta muito semelhante para a adesividade celular. Nas dimensões celulares (micrométricas), a densidade superficial de íons implantados é de 1,4 $10^5$ íons/$\mu m^2$ em PT e de 1,0 $10^5$ íons/$\mu m^2$. Outro fator a considerar é que a taxa de erosão, mesmo que preferencial, é coincidentemente igual para cada modificação. A remoção de titânio em relação à remoção de oxigênio na superfície é de 0,3 para ambas as implantações. Três e cinco camadas de $TiO_2$ são removidas em PT e

BFT, respectivamente, com depleção acentuada de oxigênio dada a remoção preferencial. Ocorre então a repassivação dos átomos de titânio na superfície, em ambiente diferenciado, com possíveis modificações do óxido formado, diferente do óxido “nativo”. Em trabalhos preliminares foram observadas mudanças positivas no tempo de integração óssea com implantação de argônio na superfície, sem um modelo conclusivo, pois não se esperava que a implantação iônica de uma espécie química inerte na superfície pudesse provocar alterações mensuráveis na resposta biológica. Um ensaio de modificação superficial através da implantação de Ar em dose de $5 \cdot 10^{15}$ íons com energia de 30 keV, cuja taxa de erosão reproduz a remoção preferencial (0,30) observada neste estudo, com o desbaste de aproximadamente 2 monocamadas de óxido de titânio poderia caracterizar esta observação. Sem as considerações eletrônicas, alterações da molhabilidade e reatividade celular pela implantação de argônio se darão exclusivamente às alterações da camada passivada.

## CONCLUSÕES

As duas superfícies modificadas por implantação iônica, PT e BFT, submetidas a ensaios *in vitro* através da cultura celular da linhagem MG-63 podem ser consideradas biocompatíveis já que apresentaram resultados comparativos com as duas superfícies comerciais, PC e TI reconhecidamente biocompatíveis, com respostas favoráveis ao crescimento e diferenciação celular. Aparentemente, a presença de P, F ou B implantados na superfície, apesar de alterar algumas características físico-químicas do material, não interfere significativamente no crescimento celular já que as respostas celulares foram semelhantes. Isto leva a suspeitar de que outros parâmetros de superfície, ainda desconhecidos devem estar envolvidos.

O ensaio *in vitro* com a cultura celular sobre as superfícies mostrou-se válido já que apresentou produção de biofilmes mineralizados característicos da diferenciação celular, etapa estimulada após a adesão e a proliferação das células que produzem a matriz inorgânica. A diferenciação celular pode ser evidenciada pelas medidas de atividade da FA e pela microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes mineralizados produzidos, além das concentrações de Ca e P determinadas por PIXE. O acompanhamento temporal da cultura permitiu propor dois momentos de observação como parâmetros para a avaliação da biocompatibilidade de materiais.

A consolidação da metodologia de utilização da linhagem MG-63, proveniente de osteossarcoma humano (câncer de tecido ósseo), além da contribuição neste trabalho, permitiu que ensaios comparados pudessem ser realizados em estudos de sinalização biomolecular de osteossarcomas caninos pelo grupo de Oncologia Comparada do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Considerando as fronteiras da interdisciplinariedade, das amostras trazidas pela metalurgia de implantes dentários, a implantação seguindo padrões de semicondutores, o crescimento celular com práticas de pesquisas de biologia celular, a caracterização através de técnicas biomédicas e físicas, este trabalho contribui com o início de estudos que compartilham profissionais das diversas áreas do conhecimento para garantir novos materiais e o estreitamento entre os campos da Biologia e da Física.

## RECOMENDAÇÕES

No contexto da homogeneidade do biofilme observado, estudos *in vivo* posteriores poderiam avaliar se a resposta de integração óssea é realmente melhor, como mencionado na literatura que relaciona menor velocidade de crescimento de matriz inorgânica e maior densidade superficial de células com melhor remodelamento ósseo. Do ensaio *in vitro* de biocompatibilidade realizado, as respostas dadas por PT e BFT sinalizam o prosseguimento em estudos utilizando modelos animais.

As condições de operação utilizadas na implantação de fósforo, flúor e boro seguiram receitas usuais na construção de dispositivos semicondutores em suas energias e doses. É possível pensar na utilização de equipamentos comerciais da microeletrônica para a modificação seriada de implantes metálicos de titânio.

A investigação em outros arranjos de material e modificação superficial, ou variações no trinômio: espécie química, energia e dose de implantação, sobre o titânio pode ser estabelecida como linha de pesquisa já que a metodologia apresentada de cultura celular prevê possíveis respostas citotóxicas como falhas observáveis nas etapas de fixação, proliferação e diferenciação celular. A atividade osteoblástica pode ser quantificada adequadamente pelas técnicas apresentadas e pode estar relacionadas com superfícies melhoradas.

A criação de filmes finos de óxido de titânio, transparentes à microscopia óptica, sobre substrato também transparente é recomendada já que permite observar produtos opticamente ativos (e.g. fibras de colágeno sob luz polarizada) em estágio pré-mineralização para caracterização da matriz orgânica.

Átomos de enxofre poderiam estar presentes como candidatos para implantação iônica já que o sistema S-Ti existe, substituindo os dióxidos de titânio da superfície. Pontes dissulfeto estão relacionadas: com a estabilização de várias proteínas, cuja forma relaciona-se com a função; com ligações entre resíduos de alguns aminoácidos, um destes resíduos presentes na fibra de colágeno.

Desconhece-se todo o ciclo da expressão de FA para o desenvolvimento dos tecidos que a produz. O conhecimento dos mecanismos reguladores da produção FA, de interesse para interpretar as repostas da cultura celular, pode ser a chave para que as medidas realizadas

tenham significado mais consistente. As altas concentrações de FA com baixa mineralização devem ser investigadas. No tecido ósseo, a FA está associada a um outro fator de crescimento ósseo, a BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) (Kim, 2004; Rawadi, 2003). A BMP constitui fator quimiotáxico, mitogênico e de diferenciação em reparos do tecido ósseo (Santos et al., 2005). Associar o acúmulo de FA no meio de cultura, através de via conhecida, à BMP, permitiria validar o que sugere Dekker (2005) com avaliação positiva de uma cobertura homogênea com baixa mineralização inicialmente (como observado neste estudo), mas com maior área de contato ósseo. Sugere-se avaliar a quantidade de BMP presente associado à FA encontrada no meio.

Dever-se-ia verificar a velocidade em que as células cobrem as superfícies, como um diferencial nos ensaios *in vitro* para que primeira etapa de apresentação da superfície possa ser mais bem avaliada (fixação e proliferação) e estabelecer ligações com medidas dos produtos da cultura celular. O fato da técnica PIXE ser um método analítico elementar que simultaneamente permite quantificar vários elementos químicos presentes na superfície ($Z > 11$) pode ainda ser técnica para acompanhar quantitativamente outros perfis elementares e sinalizadores marcados para avaliar a formação de minerais (e.g. hidroxiapatita) como a substituição controlada do cálcio pelo estrôncio nas apatitas (Santos, 2008). A quantificação através do PIXE é imediata sobre as amostras, como foi realizado na quantificação de cálcio e fósforo, não havendo a necessidade de qualquer preparação.

**BIBLIOGRAFIA**


1. Aburaya, J.H. Padronização de Análises PIXE de Amostras Sólidas em Alvos Espessos. Dissertação de Mestrado, IFUSP, 2005.

2. Almeida, W.C. et al. SIN IMPLANTES: Formulação da Política Comercial. Trabalho de Conclusão de Curso, FGV, Belo Horizonte, 2010.

3. Alves, C.M. et al. Modulating bone cells response onto starch-based biomaterials by surface plasma treatment and protein adsorption. Biomaterials 28 (2007) 307-315

4. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 21 (2000) 667-681

5. Ashcroft, N.W.; Mermin, N.D. Solid State Physics. Harcout College Publ., 1976.

6. Bayer, I.S.; Megaridis, C.M.; Contact Angle Dynamics in Droplets Impacting on Flat Surfaces with Different Wetting Characteristics. J. Fluid. Mech. 558 (2006) 415-449

7. Bet, M.R.; et al. Cell Adhesion and Citotoxicity Studies over Polyanionic Collagen Surfaces with Variable Negative Charge and Wettability. Biomaterials 24 (2003) 131-137

8. Bilezikian, J.P. et al. Principles of Bone Biology. Academic Press, 2008.

9. Braceras I. et al. Bone cell adhesion on ion implanted titanium alloys. Surface and Coatings Technology 196 (2005) 321-326

10. Braceras I. et al. Improved osseointegration in ion implantation-treated dental implants. Surface and Coatings Technology 158-159 (2002) 28-32

11. Branemark, P.I. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I Experimental studies. Stand. J. Plast. Reconstr. Surg. 3 (1969) 81

12. Brunette, D.M. Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses, and medical applications. Springer, 2001.

13. Campbell, S.A. “The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication,” Oxford University Press, 1996.

14. Carvalho, H.F.; Vollares-Buzato, C.B. Células, 1ª Ed., São Paulo: Manole, 2005.

15. Cochran, D.L. et al. The use of reduced healing times on ITI® implants with sandblasted and acid-etched (SLA) surface: Early results from clinical trials on ITI® SLA implants. Clin Oral Impl Res 13 (2002) 144-153

16. Coopers, L.F. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. The Journal of Prosthetic Dentistry 84 No. 5 (2000) 522-534

17. Cullitym B.D. Elements of X-Ray Difraction. Addison-Wesley Publ. Co., 1956.

18. Davies, J.E. Bone Engineering. Toronto: em2, 2000.

19. Dearnaley, G. Ion Implantation. Annual Review of Materials Science 4 (1974) 93-123

20. Dee, K.; Puleo, D.A.; Bizios, R. Tissue-Biomaterial Interactions. Hoboken: John Wiley & Sons, 2002.

21. Dekker, R.J. et al. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. Biomaterials 26 (2005) 5231–5239

22. Della Volpe, C.; Siboni, S. Some reflections on acid-base solid surface free energy theories. J. Colloid Interface Sci. 188 (1997) 511-515

23. Feng, B. et al. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. Biomaterials 24 (2003) 4663-4570

24. Feng, B. et al. Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and adhesion of osteoblast. Biomaterials 24 (2004) 3421-3428

25. Fowkes, F.M. Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers, New York: Plenum Press, 1985.

26. Fox, H.W.; Zisman, W.A. J. Colloid Interface Sci. 7 (1952) 428

27. Francisco, A.P. BORO: aspectos químicos, ambientais, toxicológicos e analíticos. XVI Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 2008.

28. Fukuda, E.; Yasuda, I. On the Piezoelectric Effect of Bone. Journal of the Physical Society of Japan 12 No. 10 (1957)

29. Furlan, R. Estudo da formação e das características de contatos Al/TiW/TiSi2 sobre junções rasas com aplicação da técnica AES, PhD Thesis, EPUSP, 1990.

30. Gani, D.K.; Mallineni, S.K. Fluorides in Periodontal Therapy: A Review. Smile Dental Journal 5 Issue 3 (2010)

31. Good, R.J. Contact Angle, Wettability and Adhesion: a critical review. Contact Angle, Wettability and Adhesion. Utrecht: VPS, 1993.

32. Hacking, S.A. et al. A physical vapor deposition method for controlled evaluation of biological response to biomaterial chemistry and topography. Jounal of Biomedical Materials Research Part A (2007) 179-187

33. Hanawa, T. et al. Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia. J Biomed Mater Res 36 (1997) 131-136

34. Hanawa, T. et al. Structure of Surface Modified Layers of Calcium-Ion-Implanted Ti-6Al-4V and Ti-56Ni. Materials Transactions 36 No. 3 (1995) 438-444

35. Hanawa, T. In vivo metallic biomaterials and surface modification. Materials Science and Engineering A267 (1999) 260-266

36. Huang N. et al. Hemocompatibility of titanium oxide films. Biomaterials 24 (2003) 2177-2187

37. Jensen, W.B. The Lewis Acid-Base Concepts. An Overview. New York: Wiley-Interscience, 1980.

38. Jinno, T. et al. Effects of calcium ion implantation on osseointegration of surface-blasted titanium alloy femoral implants in a canine total hip arthoplasty model. The Journal of Arthoplasty 19 No. 1 (2004) 102-109

39. Kim, Y-J et al. Bone Morphogenetic Protein-2-induced Alkaline Phosphatase Expression Is Stimulated by Dlx5 and Repressed by Msx2. The Journal of Biological Chemistry 279, No. 49 (2004) 50773–50780

40. Krupa, D. et al. Effect of calcium-ion implantation on the corrosion resistance and biocompatibility of titanium. Biomaterials 22 (2001) 2139-2151

41. Krupa, D. et al. Effect of dual ion implantation of calcium and phosphorus on the properties of titanium. Biomaterials 26 (2005) 2847–2856

42. Krupa, D. et al. Effect of phosphorus-ion implantation on the corrosion resistance and biocompatibility of titanium. Biomaterials 23 (2002) 3319-3340

43. Kudriavtsev, Yu. Maximum concentration of implanted projectiles during ion sputtering. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 160 (2000) 307-310

44. Latimer, K.S.; Mahaffey, E.A.; Prasse, K.W. Clinical Pathology. Iowa: Blackwell, 2003.

45. LAMFI – Laboratório de Análises de Materiais por Feixe Iônicos. Disponível em: <http://www.if.usp.br/lamfi>. Acessado em: Dez/2009

46. Le Guehennec, L. et al. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. Acta Biomaterialia 4(3) (2008) 535-43

47. Le Guehennec, L. et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dental Materials 23 (2007) 844-854

48. Leighton, R.B. Principles of Modern Physics. McGraw-Hill, 1959.

49. Lin D.-J. et al. Bone formation at the surface of low modulus Ti-7.5Mo implants in rabbit femur. Biomaterials 28 (2007) 2582-2589

50. Liu, H.Y. Effect of fluoride-ion implantation on the biocompatibility of titaniumfor dental applications. Applied Surface Science 254 (2008) 6305-6312

51. Liu, X. et al. Plasma surface modification of titanium for hard tissue replacements. Surface and Coatings Technology 186 (2004) 227-233

52. Liu, X.; Chu, P.K.; Ding, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Materials Science and Engineering R47 (2004) 49-121

53. Luthen, F. et al. The influence of surface roughness of titanium on b1- and b3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. Biomaterials 26 (2005) 2423-2440

54. Maeztu, M.A.; Alava, J.I.; Gay-Escoda, C. Ion implantation: surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6Al4V dental implants. Clin. Oral Impl. Res. 14 (2003) 57-62

55. Maitz, M.F. et al. Bioactivity of titanium following sodium plasma immersion ion implantation and deposition. Biomaterials 26 (2005) 5465–5473

56. Martino, J.A. m Processo CMOS Cavidade Dupla para Comprimento de Porta de 2 Micrometros, PhD Thesis, EPUSP, 1988.

57. McGavin, M.D.; Zachary, J.F. Pathologic Basis of Veterinary Disease. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007.

58. McGuire, J.; Krisdhasima, V. Relating Contact Surface Hydrophobicity to Molecular Events Influencing Biological Adhesion. Contact Angle, Wettability and Adhesion. Utrecht: VPS, 1993.

59. Mittal, K.L. Contact Angle, Wettability and Adhesion. Utrecht: VPS, 1993.

60. Moller, W. Fundamentals of Ion-Surface Interaction: Short Resume. Technical University of Dresden, 2004.

61. Montanaro, L. et al. In vitro effects on MG63 osteoblast-like cells followingcontact with two roughness-differing fluorohydroxyapatite-coated titanium alloys. Biomaterials 23 (2002) 3651–3659

62. Moseman, R.F. Chemical Disposition of Boron in Animals and Humans. Environmental Health Perspectives 102, Supplement 7: Health Effects of Boron (1994) 113-117

63. Mozzaquatro, L.H. Improvement of surface bioactivity on titanium by water and hydrogen plasma immersion ion implantation. R. Fac. Odontol. Porto Alegre 47 No. 3 (2006) 41-47

64. Nascente, P.A.P.; Bolfarini, C.; Corrêa, C.A. Caracterização de Materiais, XVIII Congresso de Aplicações de Vácuo na Indústria e na Ciência, 1997.

65. Nayab, S. et al. Adhesion of bone cells to ion-implanted titanium. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 14 (2003) 991-997

66. Nayab, S.N.; Jones, F.H.; Olsen, I. Modulation of the human bone cell cycle by calcium ion-implantation of titanium. Biomaterials 28 (2007) 38-44

67. Nayab, S.N; Jones, F.H. Olsen, I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction. Biomaterials 26 (2005) 4717-4727

68. Nebe, B. et al. Topography-induced alterations in adhesion structures affect mineralization in human osteoblasts on titanium. Materials Science and Engineering C 24 (2004) 619-624

69. Neel, E.A.A. et al. In vitro bioactivity and gene expression by cells cultured on titanium dioxide doped phosphate-based glasses. Biomaterials 28 (2007) 2967-2977

70. Park, J.B.; Bronzino, J.D. Biomaterials: Principles and Applications. CRC Press, 2003.

71. Pearce, A.I. et al. Animal model for implant biomaterial research in bone: a review. European Cell and Materials 13 (2007) 1-10

72. Pelletier, J. Anders, A. Plasma-Based Ion Implantation and Deposition: A Review of Physics, Technology, and Applications. IEEE Transactions on Plasma Science 33 No. 6 (2005) 1944-1960

73. Peres, C.M.; Curi, R. Como Cultivar Células. Guanabara-Koogan, 2005.

74. Peres, H.E.M. Estudo da formação e das características de contatos Al/TiW/TiSi2 sobre junções rasas com aplicação da técnica AES, MSc. Dissertation, EPUSP, 1990.

75. Peres, H.E.M. Implantação Iônica de Hidrogênio em Silício Monocristalino, PhD. Thesis, EPUSP, 1996.

76. Porcheron, F.; Monson, P.A. Mean-Field Theory of Liquid Droplets on Roughened Solid Surfaces Application to Superhydrophobicity. Langmuir 22 (2006) 1595-1601

77. Ratner, B.D. et al. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. California: Elsevier, 2004.

78. Rausch-fan, X.; Qu, Z.; Wieland, M.; Matejka, M.; Schedle, A. The influence of hydrophilic versus hydrophobic Ti specimens with different topographical and roughness levels on contact guidance and cellular proliferation evaluated with time-lapse photography. Dental Materials 24 (2008) 102-110

79. Rawadi, G. et al. BMP-2 Controls Alkaline Phosphatase Expression and Osteoblast Mineralization by a Wnt Autocrine Loop. Journal of Bone and Mineral Research 18 No 10 (2003)

80. Rupp, F. et al. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. Biomaterials 25 (2004) 1429-1438

81. Santos, A.A. et al. The Role of Bone Morphogenetic Protein on Bone Tissue Repair. Acta Ortop Bras 13(4) (2005) 194-195

82. Santos, P.R. A razão Sr/Ca em hidroxiapatita produzida a partir de células ósseas humanas em ambientes com diferentes concentrações de estrôncio. Dissertação de Mestrado, I-FUSP, 2008.

83. Santos Filho, S.G. Oxidação Térmica Rápida do Silicio: Influência dos Procedimentos de Limpeza e dos Perfis Temporais de Temperatura na Qualidade dos Óxidos de Porta MOS, Tese de Doutorado, EPUSP, 1996

84. Seibl, R.; de Wild, M.; Lundberg, E. In vitro protein adsorption tests on SLActive®. Staget 02 (2005)

85. Shalabi, M.M. et al. Implant Surface Roughness and Bone Healing: a Systematic Review. J dent Res 85(6) (2006) 496-500

86. SIN - Sistema de implante. Disponível em: <http://www.sinimplante.com.br/>. Acessado em: Dez/2005.

87. Sioshansi, P.; Tobin, E.J. Surface treatment of biomaterials by ion beam processes. Surface and Coatings Technology 8(3) (1996) 175-182

88. Sklodowska, A.; Wozniak, M; Matlakowska, R. The method of contact angle measurement and estimation of work of adhesion in bioleaching of metals. Biol Proc Online 1 No. 3 (1999) 114-121

89. Soares, G.A. Biomateriais. Rio de Janeiro: Fórum de Biotecnoliga e Biomateriais, 2005.

90. SRIM - Stopping and Range of Ions in Matter. Disponível em <http://www.srim.org>. Acesso em: Jul/2009.

91. Straumann®. SLActive® Scientific Studies. International Team for Implantology, 2010.

92. Szklarska-Smialowska, Z. Pitting Corrosion of Metals. Ohio: NACE, 1986.

93. Tabacniks, M.H. Calibração do sistema PIXE-SP de análise elementar. Dissertação de Mestrado, IFUSP, 1983

94. Tengvall, P.; Lundstrom, I. Physico-chemical Considerations of Titanium as a Biomaterial. Clinical Materials 9 (1992) 115-134

95. Tian, S. et al. A Detailed Physical Model for Ion Implant Induced Damage in Silicon. IEEE Transactions on Electron Devices 45 No. 6 (1998) 1226-1238

96. Tsyganov, I. et al. Modification of the Ti-6Al-4V alloy by ion implantation of calcium and/or phosphorus. Surface and Coatings Technology 158-159 (2002) 318-323

97. Tsyganov, I. et al. Structure and properties of titanium oxide layers prepared by metal plasma immersion ion implantation and deposition. Surface and Coatings Technology 174-175 (2003) 591-596

98. Van Espen, P.; Janssens, K.; Swenters, I. AXIL X-Ray Analysis software. Benelux : Canberra Packard.

99. Van Oss, C.J.; Chaudhury, M.K.; Good, R.J. Monopolar Surfaces. Advan. Colloid Interface Sci. 28 (1987) 35-64

100. Vogler, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. Advances in Colloid and Interface Science 74 (1998) 69-117

101. Walinder, M.E.P. Acid-Base Properties of Wood. Holzforschung 56 No. 4 (2002)

102. Wang, J. Functionality of Ti-O Thin Films Doped by Phosphorus: Wettability, Semiconductor Performance and Blood Compatibility. Materials Science Forum 610-613 (2009) 1017-1021

103. Wieser, E. et al. Modification of titanium by ion implantation of calcium and/or phosphorus. Surface and Coatings Technology 111 (1999) 103-109

104. Xie, Y. et al. Improvement of surface bioactivity on titanium by water and hydrogen plasma immersion ion implantation. Biomaterials 26 (2005) 6129–6135

105. Yaszemski M.J. et al. Biomaterials in Orthopedics. New York: Marcel Dekker, 2004.

106. Yonggang, Y. et al. The influence of discharge power and heat treatment on calcium phosphate coatings prepared by RF magnetron sputtering deposition. J Mater Sci: Mater Med 18 (2007) 1061-1069

107. Zaha, A.; Ferreira, H.B.; Passaglia, L.M.P. Biologia Molecular Básica. Mercado Aberto, 2003.

108. Zhao, G.; Schwartz, Z.; Wieland, M.; Rupp, F.; Geis-Gerstorfer, J.; Cochran, D.L.; Boyan, B.D. High surface energy of SLActive® implants enhances cell response to titanium substrate microstructure. J. Biomed. Mater. Res. A. 74A (2005) 49-58

# ANEXO – DESCRIÇÃO DO PRODUTO – CULTURA DE CÉLULAS MG-63

| | |
|---|---|
| **ATCC® Number:** | CRL-1427™ |
| **Designations:** | MG-63 |
| **Organism:** | Homo sapiens (human) |
| **Source:** | Organ: bone<br>Disease: osteosarcoma |
| **Cellular Products:** | interferon |
| **Shipped:** | frozen |
| **Growth Properties:** | adherent |
| **Morphology:** | fibroblast |
| **Cytogenetic Analysis:** | This is a hypotriploid human cell line. The modal chromosome number was 66 occurring in 44% of cells. The rate of cells with higher ploidies was 2.0%. Eighteen to 19 marker chromosomes were common to all cells. |
| **Age:** | 14 years |
| **Gender:** | male |
| **Ethnicity:** | Caucasian |
| **Comments:** | High levels of interferon production can be induced using polyinosinic - polycytidylic acid, cycloheximide and actinomycin D. |
| **Propagation** | ATCC complete growth medium: The base medium for this cell line is ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: heat-inactivated fetal bovine serum to a final concentration of 10%.<br>Atmosphere: air, 95%; carbon dioxide (CO2), 5%<br>Temperature: 37.0°C |
| **Subculturing:** | Protocol:<br>1. Remove and discard culture medium.<br>2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin- 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum that contains trypsin inhibitor.<br>3. Add 2.0 to 3.0 ml of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).<br>4. Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.<br>5. Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.<br>6. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.<br>7. Incubate cultures at 37°C.<br>Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:4 to 1:8 is recommended<br>Medium Renewal: 2 to 3 times per week |
| **Preservation:** | Freeze medium: Complete growth medium supplemented with 5% (v/v) DMSO<br>Storage temperature: liquid nitrogen vapor phase |
| **References:** | 1058: Billiau A, et al. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. Antimicrob. Agents Chemother. 12: 11-15, 1977. PubMed: 883813<br>23014: Takeuchi Y, et al. Relationship between actions of transforming growth factor (TGF)-beta and cell surface expression of its receptors in clonal osteoblastic cells. J. Cell. Physiol. 162: 315-321, 1995. PubMed: 7860639<br>32445: Yee A, et al. Biochemical characterization of the human cyclin-dependent protein kinase activating kinase. J. Biol. Chem. 271: 471-477, 1996. PubMed: 8550604 |