

EFEITO DA OXIDAÇÃO ANÓDICA DE  
TITÂNIO COMERCIALMENTE PURO REVESTIDO OU NÃO COM  
FIBRONECTINA NA INTERFACE OSTEOBLASTOS HUMANOS-SUPERFÍCIE  
DE TITÂNIO

Aline Raybolt dos Santos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS  
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS  
EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

---

Profa. Gloria Dulce de Almeida Soares, D.Sc.

---

Prof. Fernando Costa e Silva Filho, D. Sc.

---

Profa. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D. Sc.

---

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva, D. Sc.

---

Profa. Renata Antoun Simão, D. Sc.

---

Prof. Adalberto Luiz Rosa, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

ABRIL DE 2008

SANTOS, ALINE RAYBOLT

Efeito da oxidação anódica de titânio  
comercialmente puro revestido ou não  
com fibronectina na interface osteoblas-  
tos humanos-superfície de titânio [Rio de  
Janeiro] 2008

IX. 91 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc.,  
Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2008)

Tese – Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, COPPE

1. Biomaterial
2. Adesão celular
3. Titânio

I. COPPE/UFRJ II. Título (Série)

*“Senhor, Dá-me alma para te servir e alma para te amar.*

*Dá-me vista para te ver sempre no céu e na terra,*

*ouvidos para te ouvir no vento e no mar,*

*e mãos para trabalhar em teu nome...”*

*(Fernando Pessoa)*

*“Somente a perseverança fará com que conquistemos*

*um estágio esplêndido de felicidade.”*

*(Pablo Neruda)*

*À Deus pela confiança em me conceder mais este desafio.  
Agradeço a proteção e a força para a conclusão deste trabalho.*

*Dedico esta tese aos meus pais Aimée e Alúcio e  
ao meu avô Floriano (in memoriam)  
pelo amor e palavras de sabedoria  
nos momentos mais difíceis.*

## AGRADECIMENTOS

À professora Glória A. Soares pelo aceite no Programa e orientação deste trabalho. Agradeço o carinho, a compreensão e a dedicação.

Ao professor Fernando Costa e Silva Filho pela orientação e por me mostrar o quanto é apaixonante trabalhar com cultura de células. Agradeço a amizade e a força nos momentos mais difíceis.

Aos professores do PEMM/UFRJ por me apresentarem os conceitos fundamentais da Engenharia Metalúrgica e de Materiais nas disciplinas da pós-graduação.

À minha amiga Márcia Sader pela amizade, carinho e atenção, também por me ajudar com as lindas imagens de MEV.

Aos queridos amigos Emanuel Santos Júnior e Euler Araújo pela ajuda com a anodização e cultura de células. Obrigada pela amizade e carinho de vocês.

À Profa. Dra. Neide Kuromoto pela colaboração com lindas imagens de AFM.

Aos amigos do PEMM e do laboratório de biomateriais: Cristiane, Doris, Ingrid, Thais, Camila, Iranildes e, outros, que me ajudaram em vários momentos importantes.

Aos amigos do laboratório de Biologia celular, principalmente Gustavo Menezes e Bruno pela colaboração durante a cultura de células.

Aos amigos da CLEAR Odontologia: Etineia, Tatiana, Felipe, Regina e Marcela, por não deixarem a minha ausência, durante o curso de doutorado, comprometer nossos atendimentos.

Ao meu noivo Luiz Marcelo pela paciência e carinho durante este período.

À minha família, meus pais, irmãos, sobrinho, tios, primos e meus amigos fraternos que torceram e nunca deixaram de acreditar que seria possível finalizar com mérito este curso.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho. A conclusão deste trabalho não seria possível sem a presença, apoio e amizade de todos vocês.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D. Sc.).

EFEITO DA OXIDAÇÃO ANÓDICA DE TITÂNIO COMERCIALMENTE PURO  
REVESTIDO OU NÃO COM FIBRONECTINA NA INTERFACE OSTEOBLASTOS  
HUMANOS-SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

Aline Raybolt dos Santos

Abril/2008

Orientadores: Gloria de Almeida Soares  
Fernando Costa e Silva Filho

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A biocompatibilidade de um material está relacionada com o comportamento celular frente à sua superfície. Neste trabalho, é analisada a influência da anodização na topografia e química de superfícies de titânio, bem como a associação de fibronectina (FN) a estas superfícies. A porosidade e a textura resultante da anodização das superfícies com  $H_2SO_4$  favoreceram a adsorção de FN. Superfícies de titânio tratadas ou não por anodização e incubadas ou não com FN foram levadas a interações com células osteoblásticas humanas da linhagem HOB. Tais células se associaram mais às superfícies revestidas com FN do que aos controles. Além disso, sobre as superfícies anodizadas e revestidas com FN as células se espalharam. Em conjunto, estes resultados indicam que superfícies de titânio previamente anodizados e biomimetizados com FN são altamente compatíveis a osteoblastos humanos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D. Sc.)

EFFECTS OF ANODIZATION ON COMMERCIALY PURE TITANIUM  
COVERED OR NOT WITH FIBRONECTIN, ON THE INTERFACE BETWEEN  
HUMAN OSTEOBLAST-TITANIUM SURFACES

Aline Raybolt dos Santos

April/2008

Advisors: Gloria de Almeida Soares  
Fernando Costa e Silva Filho

Department: Materials and Metallurgical Engineering

The biocompatibility of one material is related to the behavior present by cells when they are found associated to its surface. In this work, the influence of an anodization process carried out with  $H_2SO_4$  on the texture and chemistry of titanium surfaces is analyzed, as well as the ability of fibronectin (FN) to bind to such surfaces. Both high texture and porosity presented by anodized-titanium surfaces favored FN binding. Titanium surfaces which have been submitted or not to anodization and subsequently treated or not with FN were allowed to interact with human osteoblastic cells of the HOB lineage. Such cells were found mostly associated to the surfaces that have been submitted to anodization and FN coating than to the related controls. In addition, HOB cells did spread on these surfaces. Altogether, these results point out that titanium surfaces previously submitted to anodization and coating with FN are highly compatible to human osteoblasts.

# ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Biomaterial.....	3
2.2. Titânio como material de implante.....	4
2.3. Titânio comercialmente puro.....	6
2.4. Titânio e suas ligas.....	8
2.5. Tratamentos de superfície.....	9
2.5.1. Recobrimentos.....	9
2.5.2. Tratamentos mecânicos.....	10
2.5.3. Tratamentos químicos:.....	10
Anodização.....	11
2.6. Interação célula-substrato.....	13
2.7. Fatores que afetam a adesão.....	22
2.8. Técnicas de caracterização.....	29
3. OBJETIVOS.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
Preparação das amostras.....	37
Caracterização das amostras.....	40
Cultivo e adesão dos osteoblastos.....	45
Caracterização da morfologia celular.....	46
Adsorção de fibronectina.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1. Resultados da fase experimental 1.....	53
5.2. Resultados da fase experimental 2.....	66

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
7. CONCLUSÃO.....	80
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

## 1 INTRODUÇÃO

O sucesso clínico de um implante ósseo envolve diversos fatores que não estão somente relacionados com o planejamento e a técnica cirúrgica utilizada. Propriedades químicas, físicas e mecânicas do material a ser implantado influenciam diretamente a qualidade da interface osso-implante.

O material implantado não deve produzir qualquer resposta biológica adversa, local ou sistêmica, e também não sofrer degradação quando em contato com os tecidos adjacentes. Os fluidos corporais são altamente corrosivos e muitos metais são atacados após sua inserção no corpo humano. Produtos oriundos da corrosão de alguns metais podem induzir efeitos biológicos indesejáveis como citotoxicidade, histotoxicidade, hipersensibilidade e imunogenicidade. O acúmulo de tais produtos pode provocar distúrbios na função de alguns órgãos.

O titânio possui excelentes propriedades que combinam alta resistência mecânica e resistência à corrosão, além de ser reativo quando em contato com a água e oxigênio, formando uma fina camada de óxido em sua superfície. A camada funciona como uma barreira, impedindo que íons metálicos oriundos da matriz metálica sejam liberados para o meio e também prevenindo a corrosão do material.

Diferentes tratamentos têm sido utilizados para modificar a tribologia e a química da superfície de materiais implantados em humanos, com o objetivo de melhorar sua biocompatibilidade e biointegração. Para implantes ósseos de titânio, têm sido utilizados tratamentos simples de jateamento e imersões em ácidos (FENG *et al* 2002), recobrimentos (ou revestimentos) com fosfatos de cálcio (WEN *et al*, 1998), recobrimentos derivados de sol-gel (WEI *et al*, 2002), tratamento termoquímico (NISHIGUCHI, 1999), tratamento térmico (BESS *et al*, 2001), tratamento

eletroquímico (ALBREKTSSON *et al*, 2000, SUL *et al*, 2000, 2001, 2002, SANTOS,2005), deposição química a vapor (CVD) (CILIBERTO *et al*, 1997), deposição física a vapor (PVD) (BACAKOVA *et al*, 2001), deposição iônica assistida (HANAWA, 1999) e aspersão térmica (WANG *et al*, 2001). Um outro tratamento diz respeito a anodização de superfície (KIM, 2008; LIANG,2005; SANTOS Jr, 2005; SUH, 2003).

A anodização é um método eletroquímico capaz de produzir filmes com diferentes propriedades sobre superfícies de materiais. Algumas propriedades celulares como adesão, alterações morfológicas, proliferação e diferenciação são afetadas por essas propriedades apresentadas por materiais implantáveis em humanos. Dentre elas, destacam-se a composição, a rugosidade, a tensão superficial e a carga eletrostática do óxido de titânio (ZHU, 2001,2004; SUL, 2002).

O objetivo deste estudo é analisar a associação de osteoblastos humanos a superfícies feitas de chapas de titânio tratadas por oxidação anódica e recobertas ou não com fibronectina plasmática humana.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Biomaterial

Um biomaterial ideal deveria induzir uma rápida, previsível e controlada cicatrização dos tecidos hospedeiros (OLIVEIRA & NANJI, 2004). Os biomateriais podem ser usados para implantação permanente no corpo humano ou como um suporte temporário de células e tecidos. Em ambos os casos, a superfície desses materiais deve prover sinais químicos e físicos que guiem a diferenciação e agrupamento de células para formarem tecidos mais biofuncionais (DIENER, 2004).

Segundo Tengvall & Lundström (1992), alguns pré-requisitos são desejáveis para que um biomaterial seja aplicado nos tecidos duros (ossos e dentes) e moles (tecido conjuntivo, epitelial, mucosa, etc...) como:

- Biocompatibilidade que significa uma menor toxicidade intrínseca do material, baixa da reatividade com macromoléculas, da indução de resposta inflamatória ao longo do tempo e da imunogenicidade;
- Biofuncionalidade, por exemplo, mecânica, que é diferente para osso, tecido mole ou próteses vasculares;
- Textura de superfície compatível com a adesão celular;
- Resistência à corrosão, para manter as propriedades mecânicas e impedir a degradação do material frente aos fluidos corporais;
- Bioadesividade: química, eletrostática e mecânica, com o intuito de promover uma ligação entre a prótese e o tecido adjacente combinando um período apropriado de cicatrização, evitando uma encapsulação fibrosa do implante;
- Prevenir uma adesão bacteriana e / ou facilitar sua morte;
- Baixo custo e facilidade no processamento também são desejáveis.

O critério de seleção de biomateriais é baseado principalmente na aplicação a que se destinam. Para dispositivos de aplicações em tecidos moles, se propõe a aumentar ou redefinir o tecido (ex.: implantes de seios e implantes faciais). Em indicações ortopédicas e odontológicas, os materiais são componentes de implantes estruturais (ex.: próteses de juntas e implantes de raiz de dentes) ou são usados para reparar defeitos ósseos (ex.: parafusos e pinos inseridos em osso) (PRADO DA SILVA, 1999). Um bom biomaterial precisa estimular o ambiente biológico a responder de modo positivo (PFEIFFER *et al*, 2003).

Apesar das excelentes propriedades de biocompatibilidade e bioatividade de algumas cerâmicas, suas aplicações como implantes são limitadas por possuírem baixa dureza e tenacidade. Por outro lado, os metais podem conferir aos implantes melhor resistência a tração. Com o objetivo de agregar as propriedades biológicas das cerâmicas com as propriedades mecânicas dos metais, compósitos e/ou recobrimentos têm sido desenvolvidos, na busca de um implante ideal. Vários trabalhos recentes mostram a bioatividade dos implantes de titânio recobertos com óxido de titânio (SUL *et al*, 2002, 2003, LIANG, B, 2003; LÄNGE *et al*, 2004, ZHU *et al*, 2004, XIONG, 2004, KIM *et al*, 2004, YANG *et al.*, 2004).

## **2.2 Titânio como material de implante**

O titânio é o material que reúne o maior número de requisitos para uso em cirurgias dentre os biomateriais metálicos chamados de “metais especiais”. Além do titânio, este grupo compreende o nióbio, tântalo e suas ligas, seguidos pelas ligas de cobalto.

Embora tenha sido descrito como um material de ancoragem óssea desde os anos 40, seu uso na Odontologia começou por volta dos anos 60 com o sistema de Branemark

(BRANEMARK, 1969, 1977, TENGVALL & LUNDSTRÖM, 1992). Branemark (1977) introduziu o conceito de osseointegração como sendo a ligação direta, estrutural e funcional entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais.

Quimicamente, o titânio é um elemento de transição que pertence à família *IVB* da tabela periódica, tem número atômico 22, peso atômico 47,90 e densidade 4,54 g/cm<sup>3</sup>. Em sua forma elementar, tem um ponto de fusão de 1668° C e possui estrutura hexagonal compacta (HCP) fase ( $\alpha$ ) até a temperatura de 882,5° C. Acima desta temperatura, o titânio transforma-se em estrutura cúbica de corpo centrado (CCC ou BCC) fase ( $\beta$ ) (CALLISTER, 2000, LIU, 2004).

O titânio pode corroer muito rápida ou lentamente, dependendo das condições do meio. Pode ocorrer em duas condições: em anaerobiose, onde a água é o agente de oxidação e em aerobiose, onde o oxigênio é o agente de oxidação. No ambiente fisiológico a corrosão ocorre em condições aeróbicas.

Humanos ingerem uma quantidade considerável de titânio em muitas formas químicas por dia na dieta (800  $\mu$ g Ti/d). Cerca de 40% da quantidade ingerida total ou mais ou menos 300  $\mu$ g por dia são metabolizadas. Mesmo que esse número não seja muito preciso, é muito maior do que a quantidade de oxidação que um implante de titânio pode liberar. Além disso, a meia-vida biológica (320 dias) é muito pequena para que o titânio se acumule no corpo (SCHOEDER, 1994).

O material normalmente utilizado como implante em humanos é o titânio comercialmente puro (Ti-cp). Possui módulo de elasticidade ( $15,5 \times 10^6$  psi) compatível com o do osso ( $2,4 \times 10^6$  psi), permitindo assim, uma distribuição de forças na interface implante-osso (PARR et al., 1985). Porém, outras ligas também são utilizadas, como

TiAl6V4, Ti318 e Ti350, principalmente quando se necessita de uma alta resistência mecânica (TENGVALL & LUNDSTRÖM, 1992).

### 2.3 Titânio comercialmente puro

O titânio comercialmente puro (Ti-cp) possui teores entre 98 e 99,5% de pureza e está disponível em quatro graus, apresentados na Tabela 1, variando de acordo com os teores de oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, carbono e ferro.

Tabela 1 – Composição química do titânio comercialmente puro (Ti-cp) (ASTM F67, 1998).

	<b>Composição máxima (%) p/p</b>							
	<b>GRAU 1</b>		<b>GRAU 2</b>		<b>GRAU 3</b>		<b>GRAU 4</b>	
	Chapa	Barra	Chapa	Barra	Chapa	Barra	Chapa	Barra
<b>Nitrogênio</b>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,05	0,05	0,05	0,05
<b>Hidrogênio</b>	0,015	0,0125	0,015	0,0125	0,015	0,0125	0,015	0,0125
<b>Oxigênio</b>	0,18	0,18	0,25	0,25	0,35	0,35	0,40	0,40
<b>Carbono</b>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
<b>Ferro</b>	0,20	0,20	0,30	0,30	0,30	0,30	0,50	0,50

O titânio puro grau 2 e 4 é normalmente utilizado nos implantes odontológicos, como por exemplo, nos implantes ITI e Straumann, entre outros. O grau 4 indica um material com elevado teor de oxigênio e ferro, elementos que estão em solução no titânio.

A incorporação desses elementos no titânio aumenta o limite de resistência a tração pelo efeito de endurecimento por solução sólida. As propriedades mecânicas desse material estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades mecânicas do titânio grau 4 (CALLISTER,2002).

	Resistência à tração (MPa min)	Alongamento (%min)	Módulo de young (GPa)
Forjado/destemperado	550.	20	110
Trabalhado a frio	800	15	110

Há uma tendência de se considerar o titânio como sendo ideal para implantes dentários, por ser um metal reativo, devido à formação espontânea de uma camada fina e protetora de óxido na superfície do metal à temperatura ambiente, além de ser inerte nos tecidos, não liberar íons que possam reagir com moléculas orgânicas e de ter boas propriedades mecânicas, dentre outras características. As propriedades do óxido formado nas superfícies dos implantes têm um papel importante durante o processo de osseointegração (SUL, 2002; ALBREKTSSON, 1983).

Considerando a superfície do óxido nos sistemas de implantes de Ti-cp, estudos de espectroscopia revelaram que sua espessura fica em torno de 1,5 a 17 nm, e que a composição química consiste na maior parte de TiO<sub>2</sub> (SUL, 2002; LAUSMAA,1996, KASEMO & LAUSMAA, 1991). O óxido nativo não é cristalino, possui uma estrutura basicamente amorfa (SUL *et al*, 2002). Sua rugosidade de superfície pode variar de 0,53 a 0,83 µm (Top Scan 3D measuring system) dependendo do modo de confecção do implante (WENNERBERG, 1996, SUL *et al*, 2001).

O TiO<sub>2</sub> existe em 3 diferentes formas cristalográficas: o rutilo e anatásio com estrutura tetragonal e a broquita de estrutura ortorrômbica.

## 2.4 Titânio e suas ligas

O desenvolvimento de ligas de Ti tem sido alvo de várias pesquisas. O TiAl6V4 é uma liga estável na fundição, apresenta um aumento de resistência quando submetida a tratamento térmico por apresentar estabilizadores  $\alpha$  (Al) e  $\beta$  (V), assim dizemos que coexistem as fases  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\alpha + \beta$ ) (FRAKER, 1987). O efeito tóxico do alumínio e do vanádio levou ao desenvolvimento de ligas alternativas. Como resultados, surgiram duas ligas distintas: a (TiZrNbTaPd) e a (TiSnNbTaPd), que fornece propriedades mecânicas, compatibilidade biológica e resistência à corrosão superior às ligas convencionais (OKASAKI, 1995).

As ligas mais modernas de níquel titânio desenvolveram-se a partir de uma liga conhecida por Nitinol, cuja denominação é derivada das iniciais de seus componentes e do laboratório de origem (“ni” de níquel, “ti” de titânio e “nol” do Naval Ordnance Laboratory), a partir das pesquisas do engenheiro metalúrgico Willian F. Buehler, nos anos 60. Essas ligas exibem propriedades físicas de memória de forma, maior elasticidade e aumento do tempo de ação, sendo muito utilizadas na ortodontia. No entanto, a escolha do níquel na implantodontia não é indicada devido a seus efeitos biológicos adversos (LLOYD, 1997; LIU, 2004).

O titânio e suas ligas de nióbio (Nb), tântalo (Ta), zircônio (Zr), ródio (Rh), são conhecidos por possuírem excelente resistência à corrosão na água. Quando implantados, os metais reativos Nb, Ta, Ti, Zr e Al, são protegidos por uma camada de óxido densa e passiva com baixa solubilidade e baixa reatividade a moléculas orgânicas (WILLIAN, D.F., 1976, XIAGRONG et al, 1989, TENGVALL & LUNDSTRÖM, 1992).

## 2.5 Tratamentos de superfície

Os tratamentos de superfície têm como objetivo o estabelecimento de uma ligação química e mecânica do osso com a superfície do implante. As propriedades de superfície devem incluir tanto aspectos estruturais quanto químicos, desde a escala macroscópica até o nível atômico, e são fatores essenciais na formação da base da resposta biológica aos biomateriais (KASEMO *et al*, 1991, TENGVALL & LUNDSTRÖM, 1992, LAUSMAA, 1996, SCHEIDELER *et al*, 2003, PFEIFFER *et al*, 2003, KIRBS *et al*, 2003, ZHU *et al*, 2004, RUPP *et al*, 2004).

Os tratamentos de superfície podem ser divididos em 3 métodos principais: recobrimentos, tratamentos mecânicos e tratamentos químicos.

### 2.5.1 Recobrimentos

A aplicação de recobrimentos sobre a superfície dos substratos metálicos tem por finalidade aumentar a resistência na interface osso-implante, prevenir a liberação de íons, mascarar as contaminações da superfície causadas pelos processos de fabricação, além de produzir uma superfície porosa e rugosa.

O processo de recobrimento mais comumente utilizado é o de aspersão térmica de um pó metálico ou cerâmico sobre o substrato de titânio. A técnica de aspersão térmica por *plasma spray* envolve altas temperaturas, mas mantém o substrato a uma média de 300°C, não induzindo alterações microestruturais do titânio.

A hidroxiapatita (HA) é o pó cerâmico mais utilizado e as partículas empregadas são da ordem de 20 a 40 µm. Uma desvantagem desse processo está relacionada ao colapso da interface HA-titânio como resultado da fraca união entre recobrimento e metal, podendo haver exposição local do implante metálico com conseqüente aumento da liberação de íons. Para implantes com recobrimentos porosos, a resposta química e

celular dos tecidos circunvizinhos à liberação de íons metálicos é crítica na determinação da extensão da formação de novo osso e sua subsequente adesão à superfície do implante.

Outros métodos vêm sendo pesquisados para depositar HA densa sobre o titânio, dentre eles a deposição eletroforética, processo biomimético e deposição eletrolítica.

### 2.5.2 Tratamentos mecânicos

Os tratamentos mecânicos aos quais são submetidos os implantes de Ti-cp visam à alteração da rugosidade e topografia da superfície. Podem ser obtidos por jateamento com partículas duras de óxidos de Ti, Al, ou Si e depois é recomendado um tratamento com ácido, para retirar possíveis incrustações de partículas de óxido e também para uniformizar a rugosidade criada pelo processo de jateamento.

Na usinagem, criam-se entalhes na superfície do implante que podem ser desde roscas até a criação de furos ou reentrâncias para que haja aposição de osso por entre esses entalhes.

### 2.5.3 Tratamentos químicos

Os tratamentos químicos com ácidos, anodização ou implantação iônica têm por objetivos principais a limpeza da superfície, a criação de rugosidade e ativação da superfície por meio da alteração estrutural da camada de óxido.

**Ataque ácido:** Os ácidos mais utilizados são o HF e HNO<sub>3</sub>. Após o ataque ácido, é feita a imersão em soluções de HF e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que tem por objetivo a formação de uma camada estável de óxido, após a exposição do metal ao ácido. Também são aplicados na limpeza após os tratamentos de jateamento para retirar partículas inclusas.

**Nitretação:** Existem duas maneiras de fazer a nitretação das superfícies de titânio: o aquecimento a 750 – 900 °C em atmosfera de nitrogênio gasoso ou a implantação iônica, onde o nitrogênio gasoso e o alvo de titânio são colocados em câmara de vácuo para formar TiN.

### **Anodização**

Esse tratamento é feito através da utilização de um anodo de titânio e um catodo de platina, prata ou aço inoxidável, etc., com o objetivo de produzir uma camada de óxido estável e biocompatível sobre a superfície do substrato (PUIPPE, 2003).

A célula eletroquímica é o dispositivo no qual ocorrem reações de oxi-redução, permitindo a interconversão de energia elétrica e química. As células eletroquímicas podem ser divididas em dois tipos: célula galvânica e célula eletrolítica. Numa célula galvânica o processo é espontâneo, no qual o produto da reação química é um trabalho elétrico. Na célula eletrolítica o processo não é espontâneo, no qual é utilizada energia elétrica para produzir uma reação química. Este fenômeno não-espontâneo provocado pela passagem de corrente elétrica é a eletrólise.

Uma célula eletrolítica é composta por dois eletrodos (inertes ou não), solução eletrolítica (eletrólito) e gerador. O anodo é o eletrodo em que ocorre a oxidação, isto é, o eletrodo que atrai ânions da solução e é denominado catodo o eletrodo em que ocorre a reação de redução, onde os cátions da solução são atraídos (Fig 1).

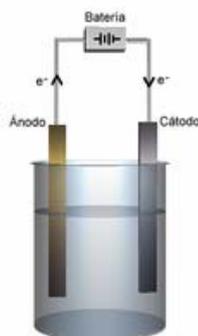


Figura 1 – Esquema de uma célula eletrolítica.

Na anodização do titânio ocorrerá a adsorção dos ânions da solução sobre a camada de óxido em formação. Este fenômeno desencadeará também outras reações que poderão promover o crescimento do óxido de titânio, processo complexo que não envolve apenas o estudo do titânio e da natureza do eletrólito. Outros parâmetros devem ser considerados, como a temperatura, densidade de corrente aplicada e velocidade de agitação da solução (SUL *et al.*, 2001; VELTEN *et al.*, 2002)

Os óxidos formados apresentam variadas modificações cristalinas e são estequiométricos ou não, por exemplo,  $TiO_2$ ,  $TiO$  e  $TiO_5$ . Em atmosfera normal o óxido termodinamicamente estável é  $TiO_2$ , o qual existe em três modificações alotrópicas: rutilo, broquita e anatásio (VELTEN *et al.*, 2002; PUIPPE, 2003 ).

A nova camada de óxido formada é porosa e está firmemente aderida ao substrato, o que beneficia a resposta biológica do implante. Outra vantagem deste processo é a possibilidade de incorporar íons de cálcio e fósforo a superfície, através do controle da composição e concentração do eletrólito (LI *et al.*, 2003).

Estudos recentes sobre a resposta biológica dos implantes de titânio demonstram que o processo de anodização constitui um bom método de otimização biológica da superfície do metal (SUL *et al.*, 2001, 2002a, 2002b, 2003; SUH, 2003; ZHU, 2004, KOKUBO, 2004.).

A anodização feita com o eletrólito de  $H_3PO_4$  em um alto potencial, produz estruturas microporosas baseadas na quebra dielétrica do óxido anódico. Abaixo da quebra do potencial (60V), não há evidências de formação de microporosidades mas apenas fendas na superfície (KIM, 2008). A avaliação da nano dureza, módulo de elasticidade e tenacidade dos filmes de óxido de titânio produzidos por oxidação anódica mostrou que o filme possui uma nano dureza maior que o titânio comercialmente puro. Os resultados sugerem que com o aumento do potencial aplicado

e da espessura dos filmes, a dureza aumente. A variação da dureza é maior para a concentração de 0,5M do que para 1,0M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (SANTOS JR, 2007). Estes resultados indicam que os filmes anódicos de titânio comercialmente puro podem ter aplicações biomédicas quando submetidos à baixa carga (<200mN).

## 2.6 Interação célula-substrato

A biocompatibilidade de um material está estreitamente relacionada com a resposta fisiológica da célula em contato com a sua superfície. Os fenômenos de interação entre células e substratos podem ser definidos de forma bastante abrangente, como mecanismos pelos quais as células são capazes de responder a estímulos do meio ambiente externo e como estes influenciam sua adesão, proliferação e diferenciação (ANSELME, 2000; ANSELME E BIRELLE, 2005). Entender os mecanismos que influenciam o comportamento celular na microestrutura da superfície pode ajudar a otimizar a superfície de futuros implantes (PFEIFFER *et al.*, 2003).

Diversos autores consideram a “adesão” como um evento que envolve as primeiras horas de contato da célula com o substrato. A maior parte dos mecanismos relacionados a esta interação é realizada por moléculas adsorvidas à membrana plasmática, uma vez que se encontram em contato com ambos os ambientes externo e interno da célula. São exemplos destas estruturas, glicoproteínas adesivas, proteínas formadoras de canais e todas as proteínas carreadoras. A adsorção, a adesão e o espraiamento pertencem à primeira fase da interação célula/material e engloba vários fenômenos até que a célula esteja adsorvida sobre o material. A qualidade desta fase influenciará a capacidade da célula proliferar e se diferenciar quando em contato com o implante (ANSELME, 2000, DI PALMA, 2005; SILVA FILHO & MENEZES, 2004; ANSELME & BIGERELLE, 2005). Podemos dividir em:

- Adsorção celular: Ocorre rapidamente e é governada por propriedades físico-químicas das células com os materiais pela ação de forças interfaciais, eletrostáticas e brownianas. Acompanhando o modelo do mosaico fluido da membrana plasmática, toda superfície celular também apresenta um mosaico de energias interfaciais e eletrostáticas. Considerando uma membrana plasmática de forma unificada e pressupondo a célula como um macrocolóide, é possível determinar a carga eletrostática e a força interfacial líquidas para uma dada superfície celular. Estas características, somadas ao efeito Browniano e a viscosidade do meio, podem determinar a adsorção ou repulsão celulares (VAN OSS, 1990; VAN OSS *et al.*, 2001).
- Fixação celular: A fixação celular é o processo pelo qual as células se ligam a biopolímeros ou a outras células por intermédio de interações específicas (como receptor-ligante e lectina-carbohidrato). A natureza desta interação consiste nas mesmas ligações químicas que prevalecem nas interações não-específicas: energia Browniana (quantitativamente constante e sempre repulsiva), interações de Lifshitz-van der Waals (quantitativamente não muito importantes, mas sempre presentes em meios aquosos), elétron-receptoras e doadoras (geralmente as mais importantes quantitativamente) e eletrostáticas (de importância bastante variável, dependendo das partículas envolvidas) (VAN OSS, 1990).
- Adesão celular: Este fenômeno é mediado por interações específicas do tipo receptor-ligante, mas com a diferença fundamental de que há o disparo de cascatas de sinalização intracelulares, que acarretam em mudanças fenotípicas da célula. Ocorre em período mais longo e envolve várias moléculas biológicas: proteínas de matriz extracelular (MEC), proteínas de membrana plasmática e proteínas do citoesqueleto que induzem sinais de transdução promovendo a

expressão de fatores de transcrição, e conseqüentemente regulando a expressão do gene (ANSELME, 2000, SILVA FILHO & MENEZES, 2004; ANSELME & BIGERELLE, 2005).

- Migração celular: Depois que a célula estabelece seu primeiro contato com o substrato, ela inicia sua fase de espraiamento. Para migrar, a célula necessita de uma dinâmica interação entre o substrato e seu citoesqueleto. Após desenvolver e fixar seu lamelipódio, as células usam interações adesivas para gerar força e energia necessárias ao seu movimento, seguidos de seu descolamento e retração.

A matriz extracelular do osso é composta por 90% de proteínas colagenosas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não colagenosas (20% de osteocalcina, 20% de osteonectina, 12% de sialoproteínas ósseas, 10% de proteoglicanas, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas do osso, etc.). Todas estas proteínas são sintetizadas pelos osteoblastos e a maioria está envolvida na adesão.

Proteínas como a fibronectina e a vitronectina têm demonstrado estarem envolvidas no processo de adesão dos osteoblastos *in vitro*. Algumas proteínas ósseas têm propriedades quimiotáticas ou adesivas devido ao fato de conterem a seqüência Arg-Gly-Asp (RGD), a qual é reconhecida por receptores de membrana plasmática, genericamente conhecidos por integrinas (GRZESIK & ROBEY, 1994, ANSELME, 2000; SIEBERS, 2004). As integrinas agem na interface entre os compartimentos intra e extracelulares e podem traduzir, a partir da junção de ligantes externos, informação interna que induza a adesão, espraiamento ou migração celular. Conseqüentemente, podem, indiretamente, regular tanto o crescimento quanto a diferenciação celulares (ANSELME, 2000, SIEBERS, 2004 LÜTHEN, 2005).

GRONTHOS *et al* (1997) relatou que osteoblastos humanos aderem preferencialmente à fibronectina, se comparado com colágeno tipo I, tipo IV e vitronectina, e fracamente à laminina e ao colágeno tipo V, não aderindo ao colágeno tipo III.

Muitos estudos *in vitro* são realizados com o objetivo de entender estes mecanismos de adesão e desenvolver experimentos que avaliem a adesão dos osteoblastos humanos por longos períodos de tempo, variando de horas a semanas (BELOTI, 2005). O modelo de cultura celular proposto por Anselme. & Biggerelle (2005), permite a formação em 21 dias de um complexo osteoblasto/matriz extracelular/interface do material (CMS). Um novo parâmetro chamado “força de adesão” (AP = *adhesion power*) foi utilizado por aqueles autores para quantificar a citada adesão.

### **Contato focal**

Os sítios específicos de adesão entre as células e a superfície do substrato são chamados de contato focal ou placas de adesão. São junções, onde a distância entre a superfície do substrato e a membrana da célula está compreendida entre 10 e 15 nanômetros. Na sua face externa encontramos as integrinas e, na interna, algumas proteínas como a talina, praxilina, vinculina e tensina as quais, modulam interações entre filamentos de actina e as proteínas receptoras de membrana (integrinas).

Em geral, células com baixa motilidade formam adesões focais fortes enquanto que células altamente móveis formam fracas estruturas de adesão.

## Proteínas de adesão

As células de mamíferos nunca são encontradas de forma isolada no corpo, mas sim ligadas a outros componentes, celulares ou não, presentes no seu ambiente. A questão fundamental é: como elas se ligam entre si e de que forma elas podem se ligar a materiais não biológicos? Esta interação geralmente envolve proteínas moleculares presentes na sua superfície. Desta forma, um estudo sobre adesão celular deve envolver uma detalhada investigação sobre as proteínas de adesão celular e as moléculas pertencentes a este complexo.

As proteínas de adesão celular são frequentemente receptores de transmembrana que atravessam a superfície da membrana celular e mantêm contato tanto com o espaço extracelular como com o espaço intracelular (Fig.2 ).

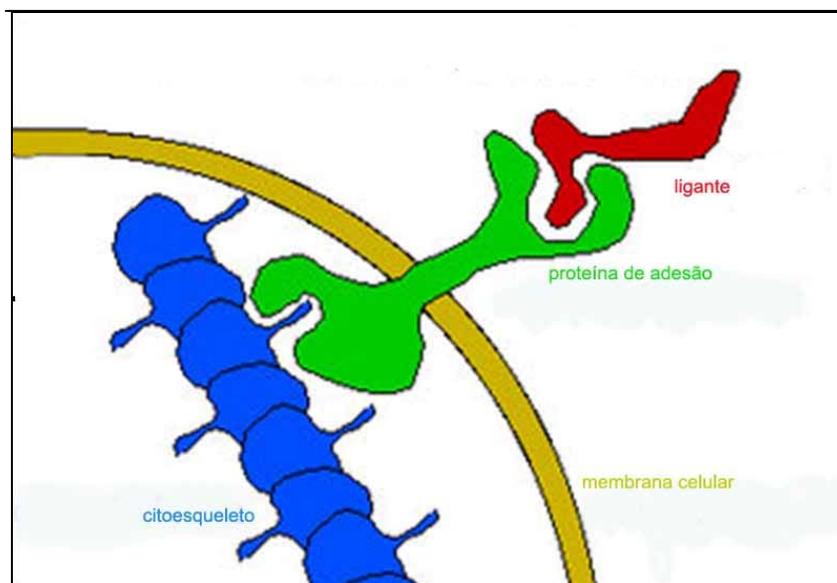


Figura. 2. Diagrama de adesão celular.

A parte extracelular da proteína de adesão pode aderir moléculas da superfície de uma célula adjacente (adesão célula-célula), ou a parte da matriz extracelular (adesão célula - MEC). A molécula que a proteína de adesão adere é chamada de ligante.

Existem famílias de proteínas de adesão celular que podem ser caracterizadas em termos de estrutura de adesão e de seus ligantes.

As proteínas de adesão irão determinar indiretamente a subsequente interação bacteriana ou celular à superfície do material implantado, representado como uma inflamação ou uma resposta imune do hospedeiro respectivamente. A adesão celular ao biomaterial é determinada por um complexo de proteínas da matriz extracelular (MEC). A MEC é um complexo estrutural que cerca e suporta as células nos tecidos mamíferos, frequentemente referida como tecido conjuntivo. A MEC é composta por 3 classes de biomoléculas:

1. Proteínas estruturais como o colágeno e a elastina;
2. Proteínas especializadas como, por exemplo, a fibronectina, vinculina e a laminina;
3. Proteoglicanas que são compostas por proteínas que estão aderidas a longas cadeias de dissacarídeos chamados glicosaminoglicanas (GAGs) formando um complexo de alto peso molecular.

O colágeno é a mais abundante proteína encontrada nos animais e o maior componente na MEC, possuindo pelo menos 12 tipos conhecidos. Predominantemente é sintetizado por fibroblastos, mas também pode ser sintetizado por células epiteliais.

### **Fibronectina**

A fibronectina (FN) tem elevado peso molecular (variam de 440.000 a 500.000 daltons) contendo cerca de 5% de carboidratos. Ela se liga principalmente a integrinas, podendo estabelecer ligações com outras moléculas tais como: colágeno, fibrina e

heparina. É um dímero e cada monômero tem 60 nm de comprimento e 2,5nm de diâmetro conectados por ligações dissulfeto (SIEBERS,2004; SOUSA, 2005)

A principal função das fibronectinas é aderir células a variadas matrizes extracelulares, exceto as matrizes tipo 4 que tem a laminina como molécula de adesão.

A molécula de fibronectina pode interagir com uma série de biomoléculas, incluindo colágenos (ENGVALL *et al.*, 1978), proteoglicanas (PERKINS *et al.*, 1979), heparina (STATHAKIS & MOSESSON, 1977), ácido hialurônico (YAMADA *et al.*, 1980), fibrina/fibrinogênio (ENGVALL *et al.*, 1978; STATHAKIS & MOSESSON, 1977), trombospondina (LAHAW, 1982), plasmina (BLUMBERG & ROBINS, 1975), gangliosídeos (YAMADA *et al.*, 1983), componentes do complemento (MENZEL *et al.*, 1981; HAUTANEN & KESKI-OJA, 1983), bem como com ela mesma (SCHWARZBAUER & SECHLER, 1999). Proteínas integrais de membrana plasmática também se ligam a fibronectina, como por exemplo, a integrina (MIYAMOTO *et al.*, 1998).

No caso particular do titânio, o processo de adsorção ocorre sobre uma superfície de óxido de titânio, resultante da oxidação do metal. Diferença significativa na adsorção de fibronectina sobre titânio ocorre em função do tempo de incubação. A máxima adsorção de fibronectina plasmática de bovino ocorre em 180 minutos de incubação (YANG *et al.*, 2003). Outros estudos relataram, usando diferentes ensaios e concentrações, uma adsorção na faixa de 0,5 a 2,5 h (TENGVALL, 2001)

Como é de se esperar, coberturas protéicas realizadas sobre superfícies inertes resultam em alteração de tensão superficial das últimas. Medidas de ângulo de contato mostraram que a cobertura de fibronectina à superfície do titânio resultou em uma maior hidrofiliabilidade da superfície (SOUSA, 2005). Quando utilizada como pré-cobertura na

densidade de 40 $\mu$ g/ml, a FN pode funcionar como ligante de adesão. As células puderam reorganizar esta camada pré-adsorvida, depositar e/ou incorporar outras proteínas que possam influenciar atividades celulares (KESELOWSKY *et al*, 2005). O principal sítio de interação celular na fibronectina está localizado no décimo módulo do tipo III da fibronectina. Este segmento contém a seqüência dos aminoácidos arg-gly-asp (RGD), reconhecida por receptores de superfície celular que promovem adesão (MOSHER *et al.*, 1980; PIERSCHBACHER & RUOSLAHTI, 1984). O receptor mais conhecido para fibronectina, em células de mamíferos, que reconhece a seqüência RGD é a integrina  $\alpha_5\beta_1$ . A química de superfície modula a estrutura e a atividade da fibronectina adsorvida. Esta diferença na estrutura da FN altera o receptor da integrina, resultando em uma adesão seletiva da integrina  $\alpha_5\beta_1$  às superfícies de OH (hidrofilicidade neutra) e NH<sub>2</sub>, nas superfícies com COOH (negativamente carregada) adere ambos o  $\alpha_5\beta_1$  como o  $\alpha_v\beta_3$ , e fraca adesão da integrina no CH<sub>3</sub> (hidrofóbica) (KESELOWSKY *et al*, 2005). A fibronectina pode ser a intermediária entre a superfície do biomaterial e a célula. Deste modo, compreender como a fibronectina pode influenciar a adesão de osteoblastos e a formação do novo tecido ósseo é um dos objetivos deste trabalho.

## **Integrinas**

As integrinas são heterodímeros receptores de transmembrana que consistem em  $\alpha$ - e  $\beta$ - subunidades, tem função importante no sinal de transdução e na organização do citoesqueleto de actina (LÜTHEN, 2005). Elas são expressas durante o desenvolvimento e sua deficiência pode causar alterações no fenótipo de vários tecidos, tais como, deficiência na proliferação de células foliculares do cabelo levando a queda

severa; vascularização anormal, defeitos na placenta, defeitos na morfogênese, crescimento e migração celular extra-endodérmica, entre outras (CONSTANT & COLOGNATO, 2004). Embora as células expressem várias integrinas, incluindo  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$ , as integrinas  $\alpha_5\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$  são os maiores receptores de FN.

A investigação dos receptores específicos de integrina na química de superfície permitiu identificar integrinas específicas que contribuam para a diferenciação de osteoblastos. MOURSI *et al* (1997) mostrou que a ligação da integrina à fibronectina é essencial para a expressão de gene específico de osteoblastos e para a sua mineralização em culturas primárias. Mineralização via modulação de sinais intracelulares que regulam a atividade transcripcional (KESELOWSKY *et al*, 2005).

As integrinas têm uma característica bi-direcional, além de transmitir os sinais extracelulares para o citoplasma levando a organização do cito esqueleto através de componentes intracelulares, também induz sinais intracelulares para a biosíntese da MEC, nova incorporação de proteínas, formação de fibronectina e diferenciação de osteoblastos. Podemos dizer que elas mediam os sinais de dentro da célula e a mesma influência o meio que a cerca. Também funciona como mecano-transdutor transmitindo forças e tensões externas, levando a remodelação da matriz.

### **Osteocalcina**

A proteína óssea, ácido gama-carboxiglutâmica (Gla) conhecida como BGLAP, BGP ou osteocalcina, é uma abundante proteína não colagenosa que compõe o osso. Produzida pelos osteoblastos, aparece no osso embrionário no momento da deposição

mineral onde se liga a hidroxiapatita de forma dependente de cálcio. A osteocalcina é uma das mais abundantes proteínas ósseas não-colagenosas encontrada no osso adulto mineralizado. A variação genética no seu cromossoma 1q interfere no grau de densidade mineral do osso (BMD) na pós-menopausa e pode predispor a osteoporose em algumas mulheres.

## **2.7 Fatores que afetam a adesão**

Os efeitos da composição do material, da química de superfície e da topografia de superfície, na adesão de células ósseas têm sido amplamente estudados (ANSELME *et al*, 2000a, 2000b, DEGLIANNI *et al*, 2001, BIGERELLE *et al*, 2002, LEE *et al*, 2002, ZINGER *et al*, 2004, FROSCH , 2003; SANTIAGO, 2004; ANSELME & BIGERELLE, 2005 )

### **Topografia**

A integração de implantes ao tecido ósseo “*in vivo*” está positivamente correlacionada com um aumento da rugosidade da superfície do implante. Osteoblastos humanos aderem melhor a superfícies rugosas que lisas (ANSELME *et al*, 2000a, 2000b, BIGERELLE *et al*, 2002, LANGE, 2002; FROSCH , 2003, PONSONNET, 2003; ANSELME & BIGERELLE, 2005).

A adesão é geralmente aumentada em superfícies com rugosidade média (Ra) em torno de 1 $\mu$ m, como a produzida, por exemplo, nos jateamentos (sandblasting) (DEGLIANNI *et al*, 2001, LEE *et al*, 2002, BIGERELLE *et al*, 2002). A rugosidade variando entre 0,8 $\mu$ m e 1,90 $\mu$ m otimizaria respostas celulares intermediárias e finais,

mas não afetaria respostas iniciais, e superfícies lisas não favoreceriam esta resposta (ROSA & BELOTI, 2003).

Estudos recentes revelaram que osteoblastos espalharam mais nas superfícies com baixa amplitude de rugosidade (buracos mais rasos). No entanto, mostraram uma alta força de adesão nas superfícies mais rugosas (ANSELME & BIGERELLE, 2005).

A rugosidade da superfície deve ser considerada não apenas em termos de amplitude, mas também de organização. Varias técnicas de tratamento produzem superfícies organizadas (isotrópicas) e desorganizadas (anisotrópicas) com a mesma amplitude. Um parâmetro de avaliação da rugosidade chamado de dimensão fractal ou Delta ( $\Delta$ ) representa a organização desta rugosidade (BIGERELLE *et al*, 2002).

Experimentos mostraram uma baixa adesão celular ao substrato e baixa proliferação em superfícies com um alto Delta, isto é, em superfícies caóticas. Quanto mais a dimensão fractal do substrato aumenta, mais a área de contato entre a célula e o substrato diminui. As células aderem menos a superfícies que apresentam muitas irregularidades devido a sua inabilidade de estabelecer área de contato suficiente com o substrato (ANSELME *et al*, 2000b).

Desta forma, a topografia deve ser considerada em várias escalas: a escala acima do tamanho da célula (macro-rugosidade) e abaixo do tamanho das células (micro-rugosidade). Quando a topografia está abaixo do seu tamanho, as células apreciam a superfície mais lisa, quando está acima, elas apreciam uma rugosidade isotrópica formada por numerosos “ninhos” (*bowl-like nests*), que favorecem a adesão (BIGERELLE *et al*, 2002).

O efeito da topografia em escala nanométrica (abaixo de 1 $\mu$ m) tem mostrado diferentes aspectos no comportamento celular. Três tipos de superfície foram investigados com diferentes escalas de rugosidade: a “nano” (sub-micrométricas), a

“micro” e a “micro mais nano” (escala micrométrica e nanométrica). Os osteoblastos responderam sinergicamente à combinação da nano topografia com micro topografia, mostrando uma densidade celular significativa após três dias (ZINGER *et al*, 2003).

A orientação celular também é um outro fenômeno importante causado pela topografia. Testes de migração celular em biomateriais com ranhuras na superfície, demonstraram que células migram mais rapidamente em materiais com ranhuras mais profundas (CHESMEL, 1995). Porém, trabalhos mais recentes mostraram que ranhuras superficiais (rasas) induzem a orientação de grupos ou células individuais ao longo do seu eixo, levando os autores a concluírem que o melhor parâmetro para a orientação da célula é a largura dos sulcos e não a sua profundidade. (DEN BRABER *et al*, 1998, PERIZZOLO *et al*, 2001). A importância destes estudos, é que osteoblastos orientados tendem a mineralizar mais rapidamente, possibilitando assim, osseointegrações tecido/implante mais eficiente (BRUNETTE & CHEHROUDI, 1999).

### **Hidrofobicidade**

A hidrofobicidade do material também exerce grande influência na adesão célula-superfície do material. Células aderem em maior quantidade sobre superfícies hidrofílicas (ALTANKOV & GROTH, 1994, ANSELME, 2000a, PONSONNET, 2003; ZHU *et al*, 2004), ao passo que a adsorção de proteínas modifica a hidrofobicidade da superfície; por exemplo, fibronectina adsorvida à superfície de titânio comercialmente puro induz a alteração na hidrofobicidade do metal (RUPP *et al*, 2004).

### **Ângulo de contato / Molhabilidade**

É definido como o ângulo formado na interface líquido-ar-superfície. Especificamente, é o ângulo formado entre um plano tangente a uma gota do líquido e

um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado, conforme esquematizado na Fig. 3 (RATNER, 1996).

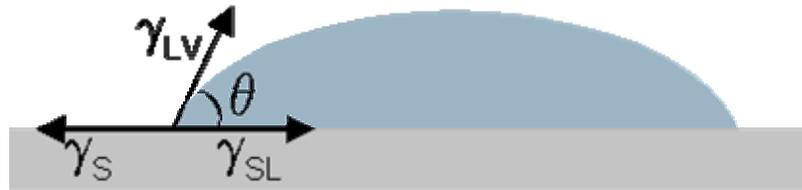


Figura 3. Definição do ângulo de contato  $\theta$  entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. Nesta figura,  $\gamma_S$  e  $\gamma_{LV}$  são a energia de superfície do sólido e a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor, respectivamente;  $\gamma_{SL}$  é a energia da interface sólido – líquido.

A molhabilidade é um parâmetro que indica o quanto um líquido pode se espalhar sobre uma superfície. Quando uma gota líquida é depositada sobre uma superfície horizontal, a molhabilidade estará ligada ao comportamento do ângulo de contato entre a linha tangente à superfície do líquido e esta superfície horizontal. Quando este ângulo de contato está acima de 90 graus, a superfície não molha, e a chamamos hidrofóbica; se o ângulo fica abaixo de 90 graus a superfície molha, caso em que é chamada de hidrofílica (Fig. 4). Quanto menor o ângulo formado entre a gota e o substrato, mais hidrofílica será a superfície (VAN OSS, 1994, 1995a, 1995b, YILDIRIM,2001; BURKARTER, E., 2006).

Uma mesma superfície pode se comportar de maneira diversa quando em contato com diferentes líquidos. Da mesma forma, o mesmo fluido pode ter comportamento distinto ao estar em contato com diferentes superfícies. Se uma superfície tem predominantemente alta energia de superfície (hidrofílica) e é recoberta

por uma pequena fração de região de baixa energia (hidrofóbica), o ângulo de contato vai aumentar quando parte da cobertura de baixa energia aumentar e diminuir for o inverso (LEE *et al*, 2000).

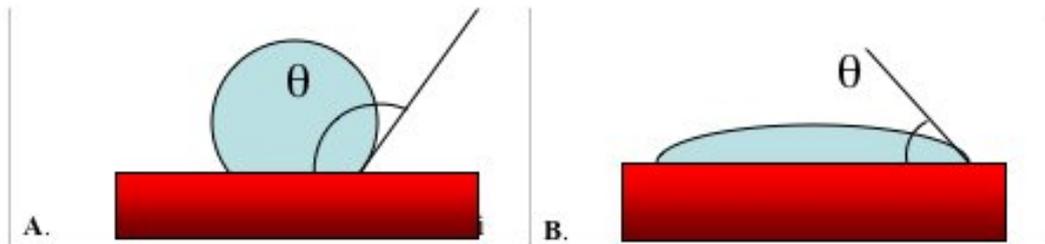


Figura 4: Representação esquemática do ângulo formado entre a gota e a superfície: A) hidrofóbica; B) hidrofílica. (UWEB, 2006).

### **Energia de superfície**

A energia de superfície pode influenciar a adsorção de proteínas e seu rearranjo estrutural sobre o material. (BOYAN, 1996, ANSELME, 2000a). Os sítios superficiais disponíveis a adsorção de proteínas são formados basicamente, por afinidades químicas que se refletem na energia de superfície. A aproximação celular também é dirigida, em parte, pela energia de superfície por meio dessas afinidades químicas.

O conceito de energia de superfície pode ser compreendido usando um líquido como exemplo. Átomos e moléculas do líquido podem se mover livremente procurando ocupar uma posição de menor energia potencial. Ou seja, um lugar onde as forças (atrativas e repulsivas), agindo em todas as direções, estejam em equilíbrio. Por outro lado, as partículas na superfície do material experimentam apenas forças dirigidas para dentro do líquido (Fig. 5). Devido a isto, as superfícies são sempre regiões de maior energia. A diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior do material se denomina energia de superfície ou tensão interfacial (VAN OSS, 1994).

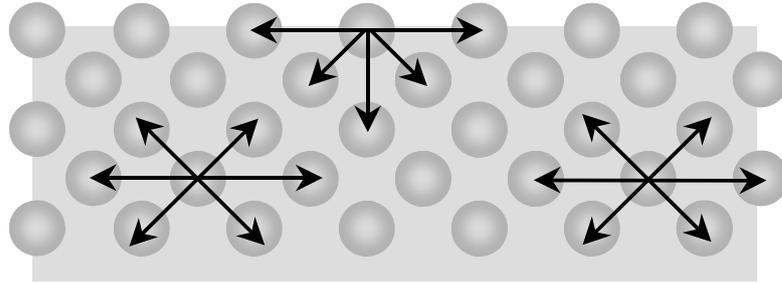


Figura 5. Forças atuando em átomos ou moléculas no interior e na superfície de um material.

É assumido que a adsorção de vapor em sólidos de baixa energia de superfície, como é o caso dos polímeros, é desprezível. Com isto,  $\gamma_{SV} = \gamma_S$ , representa a energia de superfície do sólido em uma atmosfera qualquer.

Considerando que a gota da Figura 2 esteja em equilíbrio, tem-se:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (2.1)$$

ou,

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL} \quad (2.2)$$

que é conhecida como equação de Young.

O trabalho de adesão,  $W_a$ , o negativo da energia de adesão Gibbs, entre o sólido e o líquido pode ser expresso pela equação de Dupré:

$$W_a = \gamma_{LV} + \gamma_S - \gamma_{SL} \quad (2.3)$$

Assim, combinando-se (3.2) e (3.3) obtém-se a equação de Young-Dupré:

$$W_a = \gamma_{LV} (\cos \theta + 1) \quad (2.4)$$

Esta última equação é mais útil que a equação de Dupré, pois relaciona duas grandezas determináveis com relativa facilidade e precisão,  $\theta$  e a tensão superficial do líquido  $\gamma_{LV}$ .

Fowkes (1964,1983) propôs que a energia de superfície pode ser descrita como a soma de contribuições de interações dispersivas ( $\gamma^d$ ) e não dispersivas também chamadas de polares ( $\gamma^p$ ).

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p \quad (2.5)$$

Fowkes ainda afirmou que apenas interações dispersivas eram importantes através da interface e contribuiriam para o trabalho de adesão, como expresso pela média geométrica da energia de superfície dispersiva:

$$W_a = 2(\gamma_s^d \gamma_{LV}^d)^{1/2} \quad (2.6)$$

Com isto, a equação de Young-Dupré pode ser escrita:

$$\gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 2(\gamma_s^d \gamma_{LV}^d)^{1/2} \quad (2.7)$$

A equação acima fornece um método para estimar o valor de  $\gamma_s^d$  e não da energia total  $\gamma_s$ , a partir de uma única medida do ângulo de contato, onde apenas forças dispersivas atuam no líquido, como é o caso de hidrocarbonetos líquidos, por exemplo.

Owens, Wendt e Kaelble estenderam a equação de Fowkes para uma forma mais geral:

$$W_a = 2(\gamma_s^d \gamma_{LV}^d)^{1/2} + 2(\gamma_s^p \gamma_{LV}^p)^{1/2} \quad (2.8)$$

que, combinada com (2.7) fornece:

$$\gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 2(\gamma_s^d \gamma_{LV}^d)^{1/2} + 2(\gamma_s^p \gamma_{LV}^p)^{1/2} \quad (2.9)$$

onde os sobrescritos d se referem às componentes de dispersão (não-polar) e p às componentes polares (não-dispersivas) incluindo todas as interações entre o sólido e o líquido, tais como dipolo - dipolo, dipolo induzido – dipolo, pontes de hidrogênio, etc.

A equação (2.9) é conhecida como aproximação da média geométrica e fornece uma maneira de estimar a energia de superfície de um sólido. Usando dois líquidos com

$\gamma_{LV}^d$  e  $\gamma_{LV}^p$  conhecidos, com a medida do ângulo de contato, pode-se facilmente determinar  $\gamma_s^d$  e  $\gamma_s^p$  resolvendo a equação (3.9) (VAN OSS, 1994).

Existe uma relação direta entre rugosidade e energia de superfície. O componente apolar da energia de superfície aumenta significativamente com a rugosidade, embora o componente básico diminua.

### **Composição química**

A variação na composição química da superfície do implante afeta a adesão e proliferação celular. Os efeitos positivos *in vitro* podem ser devido a incorporação de íons fosfato ou ambos cálcio e fosfato, moléculas que podem penetrar na membrana celular ou ativar receptores de membrana. A presença de íons cálcio foi relatada como sendo vantajosa ao crescimento celular, melhorando a aposição óssea a superfície do implante. Estudo concluiu que as superfícies anodizadas de titânio com diferentes concentrações de fósforo ou cálcio e fósforo não reduzem a viabilidade e o metabolismo dos osteoblastos (ZHU, 2001).

Ahmad *et al* (1999) descreveu uma diferença insignificante na adesão celular de osteoblastos nas superfícies de titânio puro grau 1 e grau 4.

### **2.8 Técnicas de caracterização**

A superfície do material pode influenciar a resposta biológica do hospedeiro. Desta forma, sua caracterização é considerada um componente importante nos protocolos de fabricação e na avaliação do desempenho dos biomateriais (HEALY & DUCHEYNE, 1992; FENG *et al*, 2002, 2003).

As superfícies dos implantes devem ser caracterizadas quanto a sua composição química, a topografia e a bioatividade. As técnicas de caracterização da composição

química avaliam o grau de pureza do metal e a presença de contaminantes provenientes do processo de fabricação, limpeza e esterilização.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

O microscópio eletrônico foi desenvolvido no início dos anos 30, pelo alemão Ernest Ruska. Esse instrumento utiliza feixes de elétrons e lentes eletromagnéticas, no lugar da luz e das lentes de vidro, permitindo ampliações de até um milhão de vezes. Há três tipos básicos de microscópios eletrônicos: de transmissão (para observação de cortes ultrafinos), de varredura (para observação de superfícies) e de ponto de prova (para visualização de átomos) (FIOCRUZ, 2006).

O equipamento de microscopia eletrônica de varredura (MEV) consiste de uma fonte que gera elétrons que é colimado ao passar por lentes eletromagnéticas, sendo focalizado em uma região muito pequena da amostra. Bobinas adequadamente colocadas promovem a varredura desse feixe sobre a área da amostra a ser examinada. A interação feixe-amostra gera uma série de sinais, como elétrons secundários, por exemplo, que são captados por um detector. Após a amplificação, esse sinal modula o brilho de um tubo de raios catódicos (TRC), que é varrido de forma sincronizada com a varredura da superfície da amostra, gerando uma imagem ponto a ponto da superfície examinada. A técnica é geralmente utilizada para observação da superfície de amostras espessas, ou seja, não transparentes a elétrons. Sua grande vantagem é sua excelente profundidade de foco, que permite a obtenção de imagens de superfícies de fraturas ou superfícies irregulares com alta definição (MALISKA, 2005).

O MEV pode formar imagens a partir de diversos mecanismos de contraste. Os mais utilizados são: contraste de número atômico (ou composicional) e o contraste topográfico. O contraste topográfico é o mais utilizado e é próprio para superfícies que

contêm relevo. Utiliza sinais produzidos pelos elétrons secundários, que são elétrons com baixa energia, oriundos da superfície da amostra permitindo visualização de detalhes topográficos com elevada definição. No contraste por elétrons retroespalhados, os elétrons coletados são os de maior energia, oriundos de uma profundidade maior da amostra e cuja energia é altamente dependente do número atômico das espécies envolvidas, podendo ser usado para identificar fases com composições químicas diferentes (SENA, 2001).

Os elementos químicos presentes na amostra podem ser detectados e quantificados através do acoplamento de um espectrômetro por dispersão de energia (EDS).

Vários trabalhos recentes mostram através de MEV que os filmes anódicos formados apresentaram morfologia porosa e topografia rugosa. As características finais da superfície da camada anódica dependem da concentração e composição do eletrólito, e do potencial aplicado entre os eletrodos. (XIAOLONG *et al.*, 2001; SUL *et al.*, 2002; SUL, 2003; KESHMIRI & TROCZYNSKI, 2003; YANG *et al.*, 2004). O emprego de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito mostrou-se efetivo para a formação de filmes anódicos uniformes, especialmente quando aplicado o potencial de 150V (SANTOS JUNIOR, E., 2005).

### **Perfilometria**

A técnica de perfilometria é empregada para quantificar a topografia superficial de um material. O equipamento utilizado para avaliar quantitativamente a rugosidade é o perfilômetro. Ele registra os movimentos de uma sonda que se move sobre a superfície do material, gerando sinais elétricos que são representados graficamente (MONCADA, 1995).

A rugosidade é usualmente analisada em três dimensões. A rugosidade média ( $R_a$ ) representa a média aritmética dos módulos das alturas dos picos e vales em relação a uma linha média;  $R_z$  é a media absoluta entre os cinco picos mais altos e os cinco vales mais profundos sobre o comprimento e o  $R_t$  é a distância pico-vale, o comprimento do pico mais alto e do vale mais profundo (BORSARI *et al.*, 2005).

Recentemente, medidas tridimensionais têm sido utilizadas empregando-se processamento digital. Uma das principais vantagens da análise tridimensional é ser da mesma dimensão que as estruturas reais, e também realçar a topografia da superfície analisada (BASTOS *et al.*, 2003).

### **Difração de raios X**

Difratômetro de raios-X pode ser usado para análise de amostras em pó, filmes finos, superfícies irregulares e policristalinas. Este equipamento permite fundamentalmente a identificação de fases e análise em amostras com estrutura cristalinas conhecidas com agilidade (SAZAKI, JM. & BLEICHER, L., 2000).

### **Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X**

A técnica de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) ou análise química através de espectroscopia de elétrons (ESCA) possibilita a obtenção de informações sobre a composição química da camada mais externa da superfície de um material.

O princípio físico envolvido está baseado no efeito fotoelétrico descrito por Einstein em 1905, mas originário das experiências de Hertz em 1886. O efeito fotoelétrico é a emissão de elétrons de uma superfície devido à incidência de luz (energia) sobre essa superfície. Segundo Einstein, a energia está quantizada em pacotes concentrados, chamados de fótons (EISBERG & RESNICK, 1979).

No XPS uma fonte de raios-X é direcionada contra a superfície do material. Os fótons emitidos interagem com os elétrons da superfície analisada. Se a energia do fóton for suficiente, um elétron será emitido da superfície do metal. Esta energia pode ser descrita como o trabalho necessário para remover o elétron do metal. A energia do elétron emitido é a diferença entre as energias do fóton e a energia gasta para remover o elétron e é medida por um analisador de elétrons acoplado ao equipamento. Estas medidas informam os elementos presentes na superfície (exceto H e He). Permitem informações sobre átomos presentes até 10 nm de distância abaixo da superfície com concentrações locais superiores a 0,1 %. A técnica ainda permite a obtenção de informações sobre as propriedades elétricas da superfície, bem como, a identificação de grupos funcionais utilizando reações de derivação (RATNER *et al.*, 1996).

Vários trabalhos atuais utilizam o XPS para caracterizar a composição química da superfície de titânio (LAUSMAA, 1996; CASALETTO *et al.*, 2001; CACCIAFESTA *et al.*, 2001; SUL *et al.*, 2002; SUL, 2003; KRUPA *et al.*, 2003; SENA *et al.*, 2003).

### **Micro análise por dispersão de energia**

A microanálise é um dos mais importantes instrumentos para a análise química de materiais orgânicos e inorgânicos. Através da identificação dos raios-X emitidos pela amostra, quando da interação com o feixe eletrônico, é possível determinar a composição de regiões com até 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro. É uma técnica não destrutiva, podendo determinar quantidades de até 1-2% dos elementos presentes na amostra.

A detecção dos raios-X emitidos pela amostra pode ser realizada tanto pela medida de sua energia (EDS) como do seu comprimento de onda (WDS). Os detectores baseados na medida de energia são os mais usados, cuja grande vantagem é a rapidez na avaliação dos elementos. Uma amostra contendo elementos na ordem de 10% (em peso)

ou mais pode ser identificado em apenas 10 s e cerca de 100 s para avaliar um elemento na ordem de 1%. Apesar da menor resolução da espectroscopia por dispersão de energia, 140eV para a raia  $K\alpha$  do Mn, quando comparada com os espectrômetros por comprimento de onda, 5-10eV, esta técnica permite obter resultados quantitativos bastante precisos.

Uma outra característica importante da microanálise é a possibilidade de se obter o mapa composicional da região em observação, permitindo que se correlacione a análise micrográfica com informações microcomposicionais detalhadas (MALISKA,2005).

### **Microscopia de Força Atômica**

Os componentes básicos do microscópio AFM estão mostrados na Figura 6. Inicialmente, a amostra é colocada sobre um piezoelétrico, um dispositivo que sofre deslocamentos micrométricos quando uma tensão é aplicada entre seus terminais. Uma área desta amostra é varrida por uma agulha (*probe tip*) e a contínua interação desta com a superfície gera tensões que movimentam o piezoelétrico. Um feixe de laser incidindo sobre o braço (*cantilever*) da agulha é refletido para um detector que, por sua vez, gera um sinal, o qual é captado pelo sistema computacional para transformá-lo numa micrografia (imagem). A partir da micrografia, um programa computacional específico é usado para calcular a dimensão fractal (CRUZ, 2000).

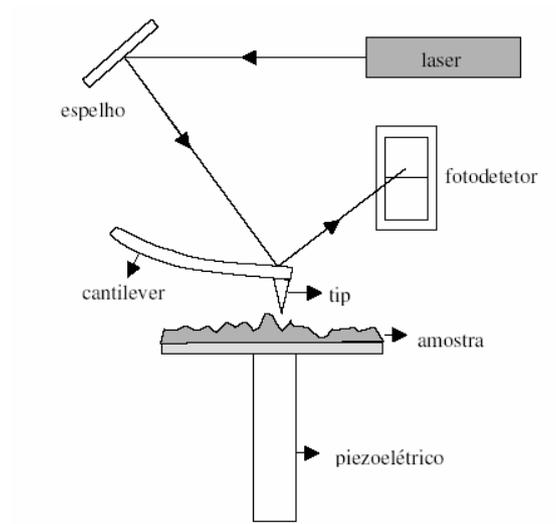


Figura 6: Esquema do AFM (CRUZ, 2000)

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Caracterizar propriedades físico-químicas e morfológicas de superfícies de titânio após os tratamentos de anodização;
- Estudar o processo de adesão de osteoblastos humanos às superfícies tratadas,
- Correlacionar as propriedades de superfície do material com o processo de adesão dos osteoblastos.
- Desenvolver substratos recobertos com fibronectina; e
- Avaliar a influência da fibronectina na interação célula/biomaterial.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Materiais**

Preliminarmente, utilizamos noventa chapas de Ti-cp ASTM grau 2 com dimensões de 8,0 X 8,0 X 0,9 mm, das quais 51 foram utilizadas para o estudo *in vitro* e 39 para a caracterização do material. Numa segunda fase, foram empregadas quarenta chapas de Ti-cp ASTM grau 2 com as mesmas dimensões descritas anteriormente, sendo que 36 foram utilizadas para o estudo *in vitro* e 4 para a complementação da caracterização do material.

Células osteoblásticas humanas (HOB) doadas pelo Banco de Células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, mantidas como osteoblastos, foram descongeladas, cultivadas em meio e utilizadas em passagem número 15 (culturas confluêntes, densidade  $5,0 \times 10^5$  células/ml) como descrito em trabalho anterior (MENESES, G, 2003).

### **Métodos**

#### ***Preparação das amostras***

As amostras de Ti-cp após cortadas em guilhotina, foram lixadas utilizando-se uma granulometria decrescente de lixas de carbetto de silício (400, 600, 800, 1200) seguidas de lavagem. O polimento foi realizado inicialmente com suspensão de alumina número 1 mais ácido oxálico para retirar os riscos da lixa e finalizado no pano OP-Chem<sup>®</sup> com suspensão de OP-S<sup>®</sup> (85ml) mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15ml) (SANTOS JR, E., 2005).

Depois do polimento, as amostras foram levadas ao aparelho de ultra-som em solução de álcool 70% por 30 minutos, trocando o líquido a cada 10 minutos, para remoção de impurezas e resíduos de material de polimento.

Os eletrólitos utilizados foram soluções de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , com concentrações de 1,4 M e 0,5 M respectivamente e o contra-eletródo foi uma placa de platina (Pt). As voltagens foram fixadas em 50 e 150 V para o  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e 200 V para o  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , com um tempo de duração de 1 minuto para cada oxidação Figura 7.

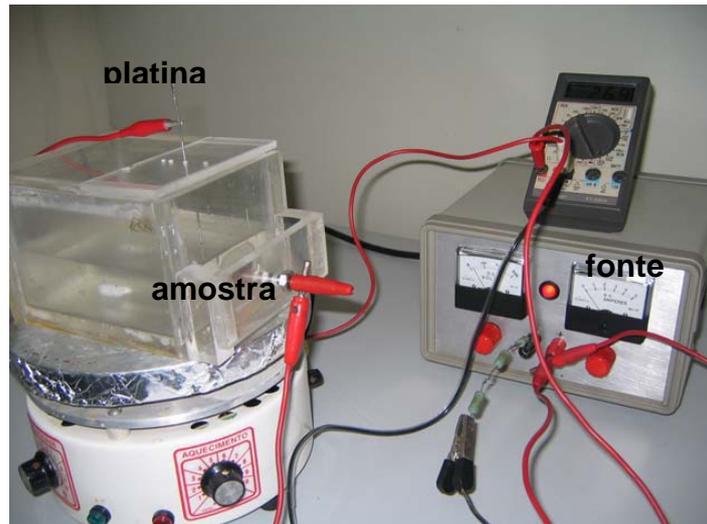


Figura 7: Aparato experimental utilizado nas aodizações.

A área de exposição do eletrólito foi padronizada através da utilização se um o'ring com diâmetro de 7,5mm (Figura 8).

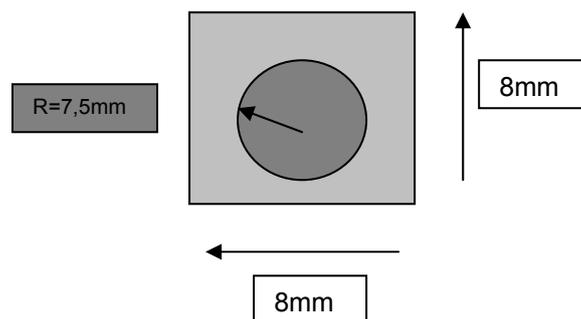


Figura 8: Vista de topo da superfície da chapa de titânio após o tratamento.

Na fase de estudo preliminar, após seguir o protocolo de preparo de amostras descrito acima, as amostras foram divididas em 3 grupos de acordo com o tratamento superficial, numeradas e classificadas, sendo:

Grupo A: Ti-cp anodizado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  de 1,4 M,  $t = 60\text{s}$ , 50 V;

Grupo B: Ti-cp anodizado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  de 1,4 M,  $t = 60\text{s}$ , 200 V;

Grupo C: Ti-cp anodizado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0,5 M,  $t = 60\text{ s}$ , 150 V;

O eletrólito utilizado para a segunda fase do estudo foi a solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , com concentração de 0,5 M e o contra-eletródo uma placa de platina (Pt). A voltagem foi fixada em 150 V e o tempo de duração para cada oxidação foi de 1 minuto. A área de exposição do eletrólito também foi padronizada através da utilização de um o'ring com diâmetro de 7,5mm. Após o tratamento, todas as amostras da primeira quanto da segunda fase do estudo foram levadas novamente ao aparelho de ultra-som, após seu tratamento de superfície, em solução de álcool 70% por 10 minutos para limpeza. Posteriormente foram embaladas individualmente em papel alumínio e esterilizadas através de radiação Gama a 25 KGy.

Nesta segunda etapa, as amostras foram divididas em 2 grupos de acordo com o tratamento superficial utilizado e numeradas de 1 a 20, sendo:

Grupo A =: Ti-cp anodizado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0,5M,  $t=60\text{s}$ , 150V +  $2\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de FN (tratamento+fibronectina).

Grupo B: Ti-cp anodizado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0,5M,  $t=60\text{s}$ , 150V (controle)

A fibronectina foi adsorvida após o tratamento de anodização, limpeza e esterilização das amostras.

## *Caracterização das amostras*

- **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Corpos de prova (8,0 X 8,0 X 0,9 mm) foram limpos no aparelho de ultra-som em solução de álcool 70% por 30 minutos, trocando o líquido a cada 10 minutos para remoção de impurezas e resíduos de material de polimento. A caracterização da superfície foi feita através de MEV (ZEISS DSM 940 e JEOL JSM-6460LV, do laboratório de microscopia eletrônica, PEMM/UFRJ), operando a 15kV. Foram obtidas três imagens por amostra e três amostras por tratamento de superfície. Os aumentos das imagens obtidas foram de 500, 3000, 5000 e 1000 vezes. As imagens capturadas foram processadas através do Adobe Photoshop. Para quantificar e medir o tamanho dos poros foi utilizado o programa Imagem Pro Plus. A análise estatística foi realizada através do programa SPSS.

- **Perfilometria**

A rugosidade das superfícies foi avaliada por perfilometria (perfilômetro Dektak IIA), onde se fez uma varredura de 2 mm. Foi medido o Ra de 10 por amostra, utilizando-se 3 amostras para cada tratamento.

- **Microscopia de força atômica (AFM)**

A superfície resultante de deposição do filme fino de óxido de titânio foi analisada por AFM Shimadzu, SPM-9500J3, scanner (30x30) microns, cantilever de SiN<sub>4</sub> com constante elástica de 42N/m. As varreduras foram feitas em seções de 30 µm e a topologia resultante foi analisada através do software SPM.

A avaliação da rugosidade da superfície através do AFM foi realizada através de medidas de 10 pontos horizontais e 10 outros pontos verticais (Figura 9).

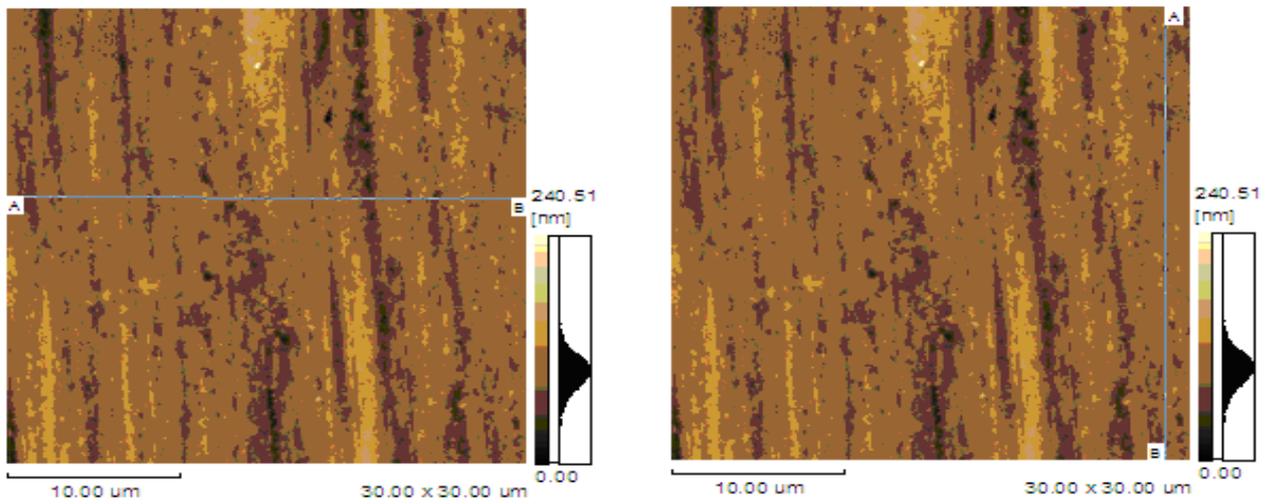


Figura 9: Imagens do AFM

Foi utilizado como parâmetros de medida o Ra conforme descrito em Zygo Corporation (2002) que compreende a média entre a rugosidade da superfície em nanômetros (Fig. 10).

$$R_a = \frac{\bar{Y}_1 + Y_2 + Y_3 \dots Y_N}{N} \quad (4.1)$$

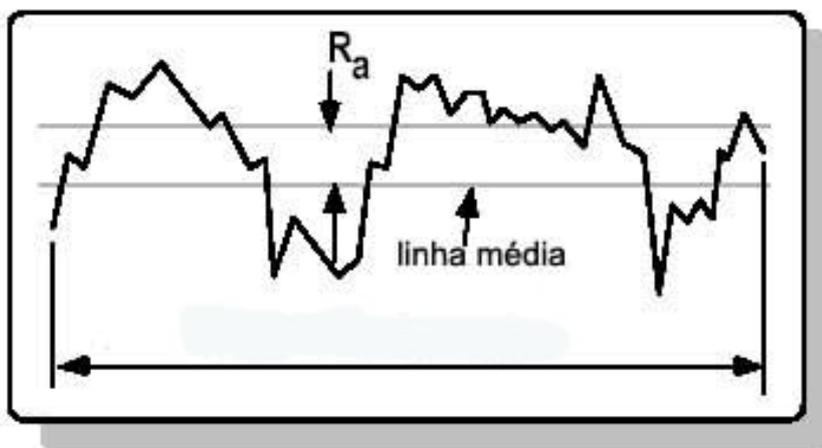


Figura 10: Esquema mostrando a medida de Ra: média entre a rugosidade da superfície (nm)

A distância vertical entre o topo mais alto e o vale mais baixo (nm) é descrito como Ry (Fig. 11).

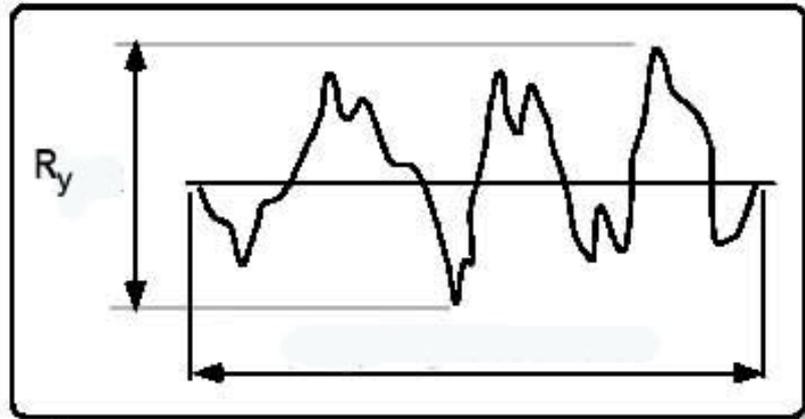


Figura 11: Ry (Rmax): distância vertical entre o topo mais alto e o vale mais baixo (nm)

O Rz (Fig.12) é a média absoluta dos 5 picos mais altos e dos 5 vales mais baixos (parâmetro ISO 10) em nanômetro, conforme descrito na equação abaixo:

$$R_z = \frac{(P1+P2...P5)-(V1+V2...V5)}{5} \quad (4.2)$$

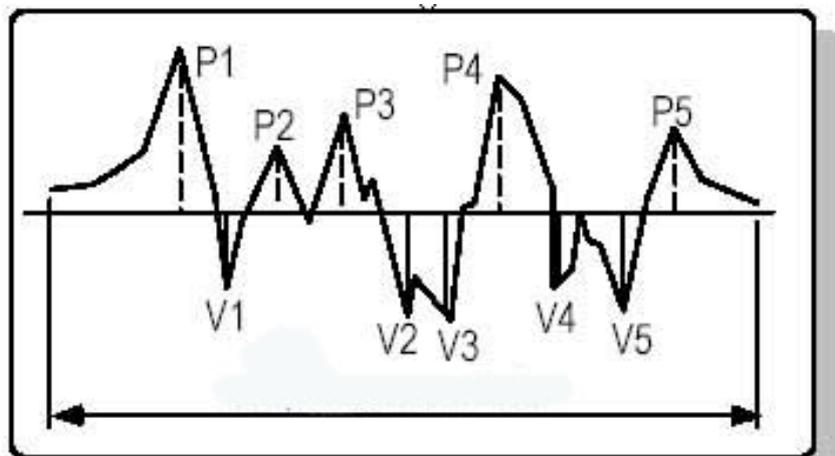


Figura 12: Esquema mostrando a medida de Rz.

- **Difração de raios X (DRX)**

O difratograma das superfícies foram realizados através do Profile Data Ascii Dump (XRD) por geometria Bragg-Bretano ( $\theta$ - $2\theta^\circ$ ), corrente de 30mA e voltagem de 40Kv.

- **Carga de superfície**

A carga eletrostática de superfície das amostras foi indiretamente avaliada por medidas de adsorção do corante catiônico cristal violeta, onde 0,1% de cristal violeta em 0,145M NaCl + 0,01M fosfato, a pH 7,2, foram gotejados nas superfícies. Em seguida, o excesso de corante foi aspirado e desprezado, e aquele que permanecia associado às superfícies foi submetido à espectrofotometria ( $\lambda=585\text{nm}$ ).

- **Avaliação da adsorção de fibronectina**

Solução estoque de fibronectina sérica humana (Sigma, Chem Co, EUA) foi diluída para concentração final de  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . A solução foi depositada ou não sobre a superfície de titânio, a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente a proteína foi solubilizada e avaliada quantitativamente sua adsorção por espectrofotometria ( $\lambda=545\text{nm}$ ). Os resultados encontram-se expressos em unidades arbitrárias (u.a.).

- **Microanálise por dispersão de energia (EDS)**

A caracterização através do EDS mostrou a composição química, o grau de pureza do metal e a presença de contaminantes provenientes do processo de fabricação, limpeza e esterilização.

- **Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS)**

Esta técnica foi utilizada para avaliar a estrutura e a composição química do material. Durante a oxidação anódica, pode ocorrer a adsorção de íons provenientes da solução eletrolítica na camada de TiO<sub>2</sub> formada. O XPS fornece informações sobre os elementos químicos presentes na superfície mais externa da camada de TiO<sub>2</sub>. Foi avaliada a composição química das superfícies tratadas por H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 200V e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 150V e realizada a deconvolução do oxigênio e do titânio através do XPS PHOIBOS 100 e XR50 da SPECS (COPPE/UFRJ).

- **Molhabilidade**

Ângulos formados por gotas sésseis de água destilada, etanol ou glicerol na interface ar-superfícies-líquido foram medidos por goniometria (goniômetro Krüss, Lab. de química de interface, COPPE). Três gotas de aproximadamente 20μL foram depositadas sobre regiões diferentes de uma mesma amostra, sendo que 3 amostras foram utilizadas para cada condição.

- **Energia livre de superfície**

Para determinação da energia livre das superfícies estudadas foi utilizada a equação descrita por Fowkes (1964,1983) que propôs que a energia de superfície é a soma de contribuições de interações dispersivas ( $\gamma^d$ ) e não dispersivas também chamadas de polares ( $\gamma^p$ ). Foi utilizado os ângulos do glicerol e etanol para achar a energia de superfície.

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p \quad (4.3)$$

### ***Cultivo e ensaios de adesão de osteoblastos***

Células HOB foram mantidas em garrafas de cultura de poliestireno (75 cm<sup>2</sup>; Falcon, EUA) mostradas na Figura 13, contendo meio de cultura Dulbecco Medium Eagle-Modified (DMEM) com baixa concentração de glicose (GIBCO) e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Soromed). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,2 e as culturas mantidas em estufa a 37° C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, até confluência.



Figura 13: Garrafas de cultura de poliestireno.

Para quantificar a adesão celular às superfícies de titânio, as células HOB foram previamente incubadas em meio contendo <sup>3</sup>H-timidina. Após 24 horas de incubação com 2 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina em DMEM com soro, em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram recolhidas por prévia digestão enzimática com 0,1% tripsina (Sigma Chem Co, EUA) feita em 0.25% Verseno (DIFCO, EUA) por 5 min a 37°C, centrifugadas (1500 rpm; 10 min), lavadas em DMEM sem soro (duas vezes; 1500 rpm, 10 min/vez) e ensaiadas.

A densidade celular da suspensão foi estimada por contagem hematimétrica e ajustada para 5,0 x 10<sup>5</sup> células/ ml (gota de 114 µL por amostra). Foram colocadas 3

placas de titânio / poço, para cada tratamento. Para isso utilizamos uma placa de seis poços (Falcon, EUA). Um dos controles (Ctr +) representava o número total de células aderidas ao fundo dos poços; isto é, na ausência de titânio. O total de células na solução (Ctr -) foi obtido através da suspensão lisada e recolhida em tubos Eppendorf.

As chapas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 30, 120 e 240 minutos, para o estudo da adsorção e adesão celular. Os cilindros foram lavados com PBS 0,01M para retirar as células não aderidas e, em seguida, adicionados 114µL de solução de lise (0,1% de SDS em NaOH 0,1%).

A adesão osteoblasto/substrato foi estimada pela contagem da radioatividade associada às amostras, em contador de cintilação líquida (1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, LKB Wallac). As amostras foram adicionadas a 6ml de Cytoscint ES (ICN Biomedicals), que depois foram levadas para contagem no cintilador líquido.

### ***Caracterização da morfologia celular***

- **Microscopia eletrônica de varredura**

As células aderidas ao substrato foram fixadas usando uma solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1% por 1h e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1,0% em tampão cacodilato de sódio 0,1% por 15 minutos. Após fixação, as células foram desidratadas por imersão em soluções aquosas de etanol com concentrações crescentes (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%). Cada imersão durou cerca de 10 minutos sempre mantendo a amostra úmida para prevenir sua desidratação. A secagem das amostras foi realizada no aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030) utilizando-se CO<sub>2</sub> como substituto, e posteriormente foram recobertas por um fino filme de ouro (Sputtering device, Balzers) e examinadas no MEV (Zeiss DSM 940A) (Fig. 14).

As observações ultra estruturais foram feitas através do MEV operando a 15 Kv com aumentos de 2000, 3000 e 5000 vezes.

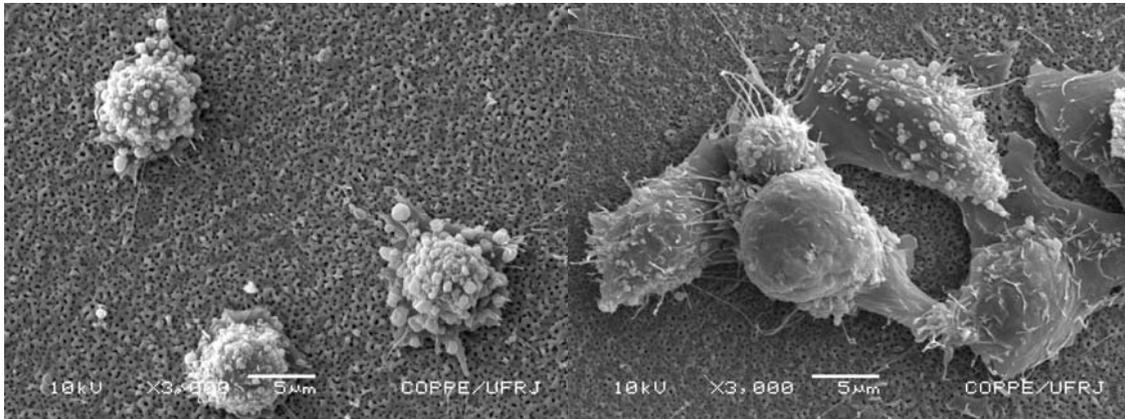


Figura 14: Micrografia (MEV) dos osteoblastos cultivados por 30' nas placas anodizadas de Ti sem (esquerda) e com adsorção de fibronectina (direita) (3000x).

- **Microscopia óptica**

Foi utilizada microscopia ótica com contraste de fase para determinarmos a densidade e a viabilidade celular. A contagem das células pré incubadas com azul de tripan foi feita em câmara de Neubauer (Fig. 15).

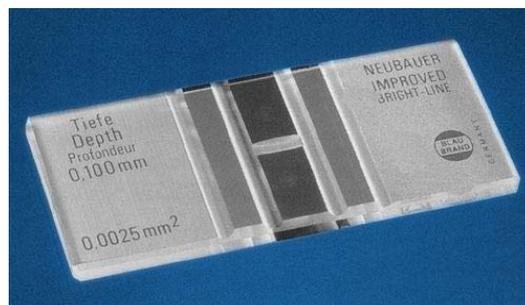


Figura 15: Fotografia representativa da câmara de Neubauer (Inlab).

Esta câmara contém um retículo com 9 quadrados de 1 mm<sup>2</sup> de área, tendo um total de 9 mm<sup>2</sup> de superfície. Cada um desses 9 quadrados é subdividido: quatro

quadrados externos são divididos em 16 pequenos quadrados ( $1/16$  do  $\text{mm}^2$ ), um quadrado central é dividido em 25 pequenos quadrados ( $1/25$  do  $\text{mm}^2$ ). Cada um destes, por sua vez, é dividido em 16 quadradinhos ( $1/400$  do  $\text{mm}^2$ ). A profundidade da câmara é de 0,1 mm e o volume total é de  $0,9 \text{ mm}^3$  (Fig 16)

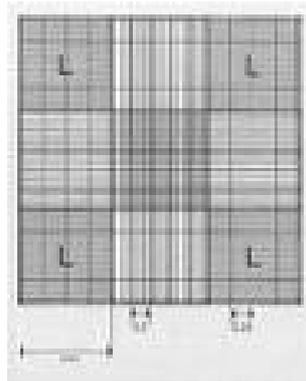


Figura 16: Imagem mostrando o retículo da câmara de Neubauer.

### ***Adsorção de Fibronectina***

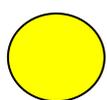
As soluções estoque de fibronectina sérica humana (Sigma) foram diluídas para concentração final de  $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , em tampão PBS 0,01M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4.\text{H}_2\text{O}$  0,01M (Reagen) e deixadas para adsorção sobre as superfícies tratadas por 2 horas em temperatura ambiente (MENEZES, 2003). O controle negativo, isto é, placas sem fibronectina adsorvida, foi deixado com a mesma quantidade de PBS pelo mesmo tempo. Previamente à interação com os osteoblastos, os substratos recobertos eram lavados com o tampão utilizado na diluição para retirar moléculas não adsorvidas.

Foi utilizado o mesmo protocolo de preparo de amostras para MEV descrito anteriormente. A caracterização da morfologia celular foi feita através do MEV trabalhando em 15 Kv com aumento de 3000 vezes. Foram obtidas quinze imagens por amostra e três amostras por tratamento de superfície.

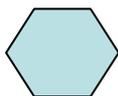
Para quantificar e medir o tamanho das células foi utilizado inicialmente o programa Adobe photoshop para tratamento das imagens e, posteriormente, o programa Imagem Pro Plus. O objetivo foi quantificar o total de células em forma de “bola”, com adesão fraca e o total de células espalhadas, consideradas aderidas, nos tempos de 30, 120 e 240 minutos. A análise estatística foi realizada através do programa SPSS.

Dividimos a morfologia das células conforme descrito por ZHU (2004) em três grupos: esféricas ou não espalhadas, parcialmente espalhadas e totalmente espalhadas. Observamos que no mesmo artigo, as células foram quantificadas apenas de acordo com o formato, mas não foi medido o tamanho. Então inserimos na avaliação, além de sua forma, as seguintes medidas esquematizadas na Figura 17:

- Não espalhadas ou esféricas, menores que 60  $\mu\text{m}$ , onde as protrusões citoplasmáticas e lamelipodios ainda não foram produzidos.
- Polimórficas menores que 100 $\mu\text{m}$  ou, parcialmente espalhadas, quando as células começam a se espalhar lateralmente para um ou mais lados.
- Polimórficas maiores que 100 $\mu\text{m}$  ou totalmente espalhadas: extensões da membrana plasmática para todos os lados, a célula está achatada com uma larga área de contato com o material.



**Esférica < 60  $\mu\text{m}$**



**Polimórficas  
60 a 100 $\mu\text{m}$**



**Polimórficas >100 $\mu\text{m}$**

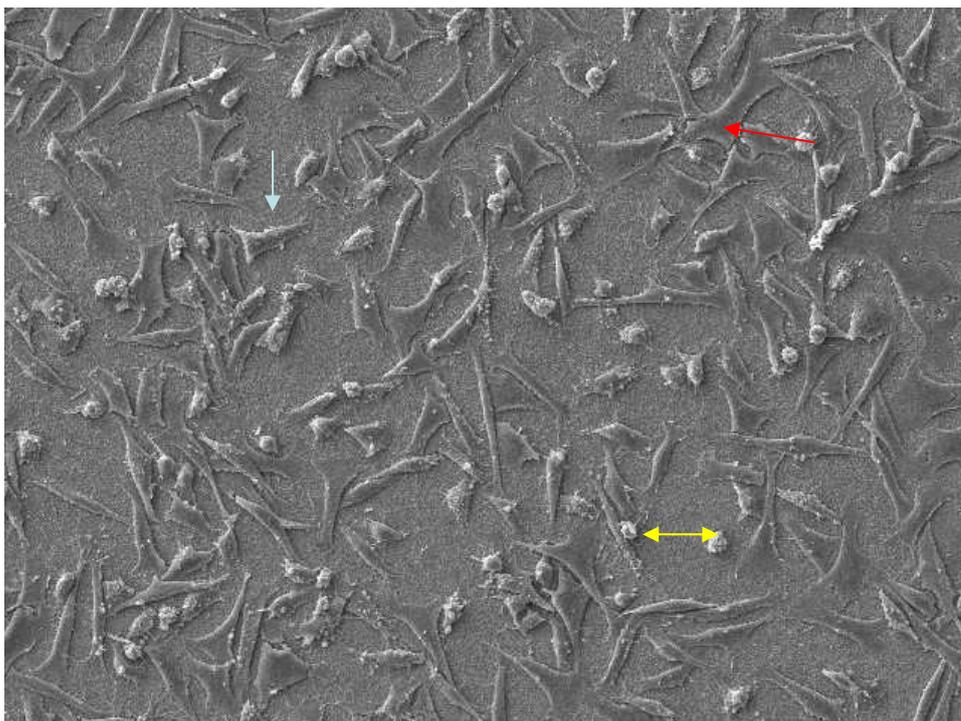


Figura 17: Micrografia mostrando a diversidade morfológica das células (300x).

Através da análise das micrografias avaliamos o número de células por imagem e suas respectivas áreas nas superfícies com e sem fibronectina. Inicialmente as imagens de MEV eram compiladas para o programa Image Pro plus (Figura 18).

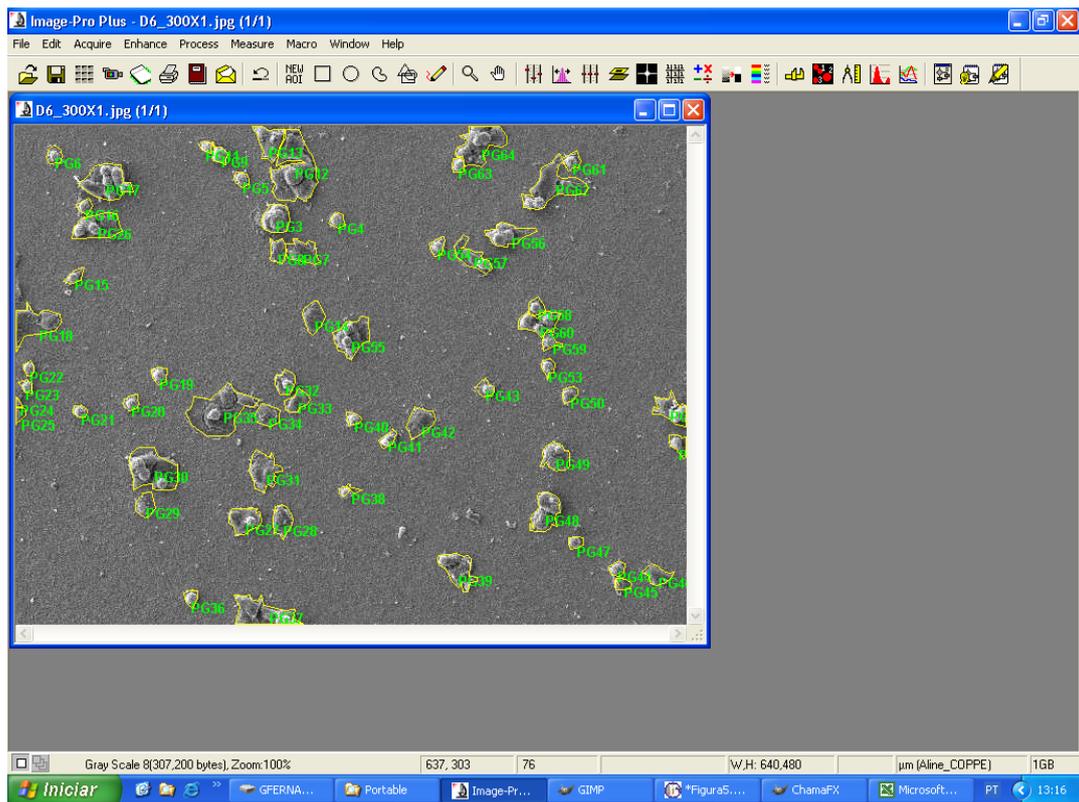


Figura 18: Esquema mostrando o contorno das células através do Image Pro Plus.

Como a imagem tem um background muito próximo da coloração da célula, o programa foi incapaz de fazer a contagem automaticamente. Desta forma, o contorno manual das imagens das células foi realizado e posteriormente medida a quantidade de células por campo e sua área média (Figura 19).

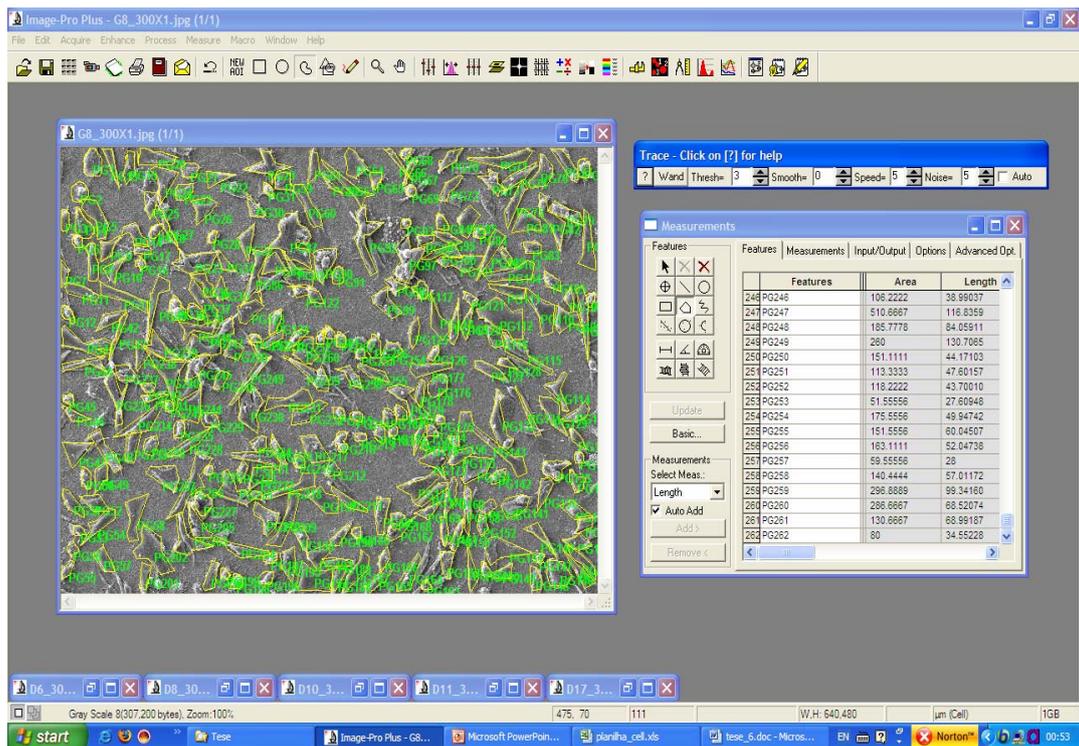


Figura 19: Imagem da tabela de medidas de área e comprimento celular.

### ***Análise Estatística***

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e do teste T, utilizando o software SPSS versão 6.0 para Windows.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Resultados da fase experimental 1**

O objetivo inicial foi observar o efeito das soluções na anodização da superfície. Identificar se o aumento na voltagem influenciaria um aumento na rugosidade da superfície e se este teria influencia na adesão de osteoblastos.

#### **Caracterização das superfícies**

- **Microscopia eletrônica de varredura**

A caracterização da superfície feita através do MEV, resultou em morfologias distintas para cada tratamento utilizado.

O tratamento de superfície com o eletrólito  $\text{H}_3\text{PO}_4$  de 1,4M, foi realizado utilizando duas voltagens: 50 e 200 V.

No tratamento A, observamos uma superfície irregular, porém com pouca porosidade. Em algumas regiões, não havia formação de poros e a morfologia se assemelhava a do titânio sem tratamento de superfície. Outras revelaram a formação de pequenos vulcões na superfície, evidenciando o efeito da liberação de  $\text{O}_2$  dentro do filme (Figura 20).

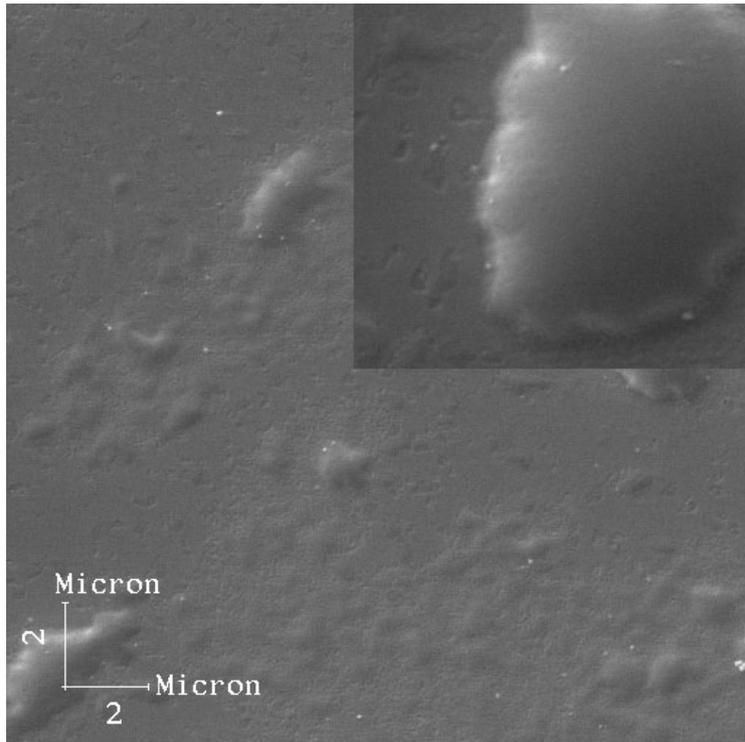


Figura 20: Tratamento A: Ti-cp anodizado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  de 1,4M,  $t = 60$  s, 50V (5000x) e no aumento (10000x)

O tratamento B apresentou poros irregulares, às vezes circulares, outros ovalados. Em algumas regiões, a imagem sugeria uma superposição de camadas (Figura 21). Corroborando outros autores (KIM, 2008; SANTOS, 2005; YANG, 2004), o aumento do potencial aplicado para uma mesma concentração de eletrólito aumentou o tamanho médio dos poros e a porosidade da superfície. A anodização com o eletrólito de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  com alto potencial (200V) produz estruturas microporosas baseado na quebra dielétrica do óxido anódico. Abaixo da quebra da constante dielétrica (50V), não há evidências de formação de microporosidade (KIM, 2008).

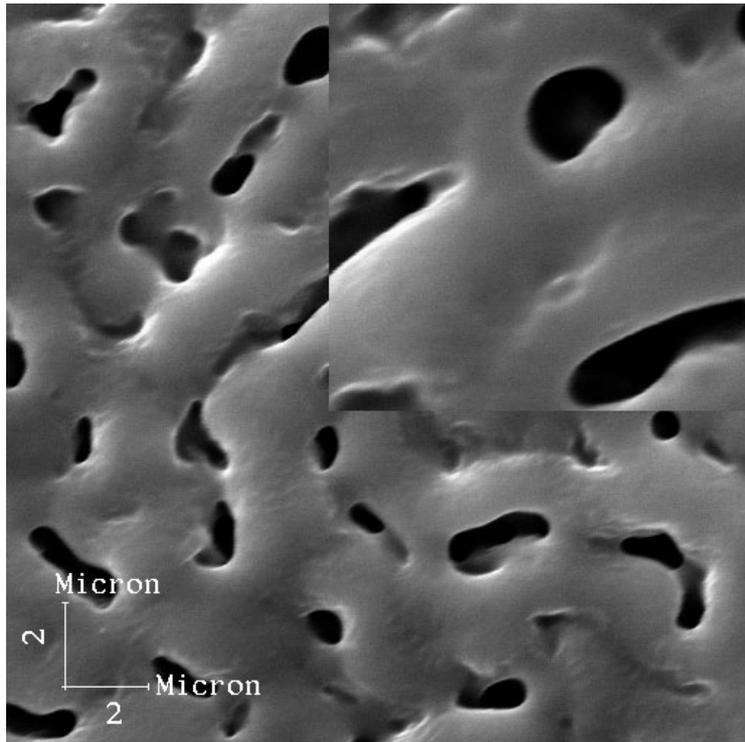


Figura 21: Tratamento B: Ti-cp anodizado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  de 1,4 M,  $t = 60\text{s}$ , 200 V (5000x) e no aumento (10000x)

As amostras tratadas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0,5 M apresentaram superfície com poros menores e mais regulares que as tratadas com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  de 1,4 M. Esses poros apresentaram morfologia circular em sua maioria (Figura 22).

Baseado no que foi previamente relatado na literatura (SANTOS, 2005), o potencial constante de 100V não seria suficiente para formação de poros no tratamento de anodização com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0,5 M. Por este motivo, aumentamos o potencial para 150V onde houve uma formação significativa de poros.

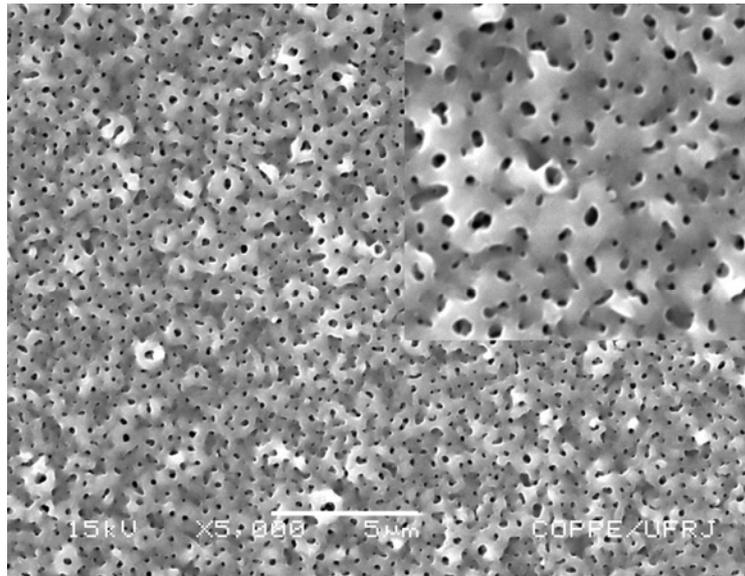


Figura 22: Tratamento C: Ti-cp anodizado à  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0,5 M,  $t = 60$  s, 150 V (5000x) e no aumento (10000x).

- **Porosidade da superfície**

A partir das imagens em MEV, foram identificados o tamanho e número de poros de cada superfície. A morfologia da superfície é significativamente influenciada pela composição do eletrólito e do potencial aplicado, quanto ao número e tamanho dos poros.

O tratamento de superfície A mostrou início de algumas erupções e formação de poucos poros. Corroborando alguns autores que indicam que a formação do óxido é muito rápida sendo dissolvido na solução (KIM, 2008).

O tamanho e número de poros foi estatisticamente diferente nas três superfícies estudadas. O número de poros foi diretamente proporcional ao aumento do potencial (Figura 23). O tamanho dos poros foi inversamente proporcional ao aumento do potencial aplicado, diminuindo quando a voltagem era aumentada (Tabela 3).

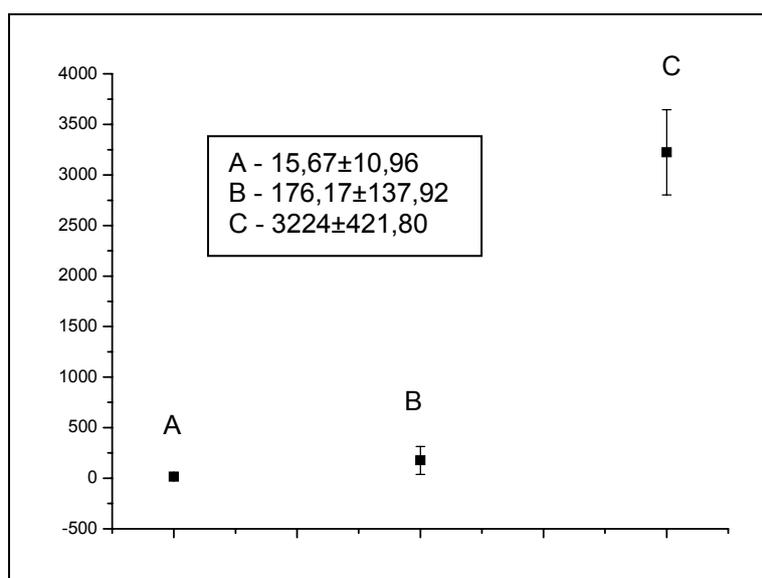


Figura 23: Número de poros (u/5µm) e desvio padrão de A (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> -50V), B (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> -200V) e C (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -150V).

A superfície B mostrou poros mais definidos e delimitados, às vezes unindo-se com outros. O tamanho médio dos poros foi de 0,94 µm<sup>2</sup>. Enquanto a superfície C mostrou poros bem menores como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Tamanho dos poros descrito como a área média em µm<sup>2</sup>.

Superfícies		
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (50V)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (200V)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (150V)
1,24 ± 1,07	0,94 ± 0,90	0,14 ± 0,04

Existe significância estatística entre as condições apresentadas. (ANOVA: α=0,05)

Em acordo com os resultados apresentados, há uma tendência ao aumento do número de poros com o aumento da voltagem nas superfícies tratadas com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

- **Perfilometria**

A análise estatística através da análise de variância mostrou diferença estatisticamente significativa entre as três condições de tratamento (Tabela 4).

Tabela 4: Rugosidade (média de Ra  $\pm$  desvio padrão)

<b>Superfícies</b>		
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50V)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (200V)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V)</b>
0,08 $\pm$ 0,013 $\mu$ m	0,19 $\pm$ 0,0003 $\mu$ m	0,11 $\pm$ 0,025 $\mu$ m*

Existe significância estatística entre as condições de anodização para as diferentes soluções. (ANOVA:  $\alpha=0,05$ )

Os resultados de rugosidade obtidos com o perfilômetro estão em concordância com outros autores (SANTOS, 2005) e mostram a variação da rugosidade com o eletrólito e o potencial aplicado. Porém, a técnica de perfilometria por contato gera resultados pouco precisos quando a espessura do recobrimento é pequena devido à dificuldade da visualização perfeita do degrau.

A superfície B apresentou uma rugosidade maior apesar de possuir poros maiores e em menor número se comparada à superfície C. Provavelmente, isso se deve ao fato da dificuldade da ponta em detectar poros muito pequenos.

- **Microscopia de força atômica (AFM)**

Dependendo do tipo de eletrólito utilizado e voltagem final aplicada, o óxido apresentou-se distribuído de diferentes maneiras quanto a sua rugosidade. Os parâmetros de rugosidade média (Ra) estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Rugosidade média (Ra/ $\mu\text{m}$ )(média  $\pm$  desvio padrão)

<b>Superfícies</b>		
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50V)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (200V)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V)</b>
0,02 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,001

Existe significância estatística entre as condições de anodização para as diferentes soluções. (ANOVA:  $\alpha=0,05$ )

Seguindo os mesmos parâmetros, avaliamos ainda o Ry (tabela 6) e Rz (tabela 7) confirmando a menor rugosidade da superfície B.

Tabela 6: Rugosidade máxima (Ry/ $\mu\text{m}$ ) (média  $\pm$  desvio padrão)

<b>Superfícies</b>		
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50V)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (200V)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V)</b>
0,1 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,01

Tabela 7: Rugosidade média absoluta (Rz/ $\mu\text{m}$ ) (média  $\pm$  desvio padrão)

<b>Superfícies</b>		
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50V)</b>	<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (200V)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V)</b>
0,07 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,01

As imagens de AFM das superfícies tratadas com  $H_3PO_4$  -200V e  $H_2SO_4$  -150V estão representadas nas figuras 24 e 25 respectivamente.

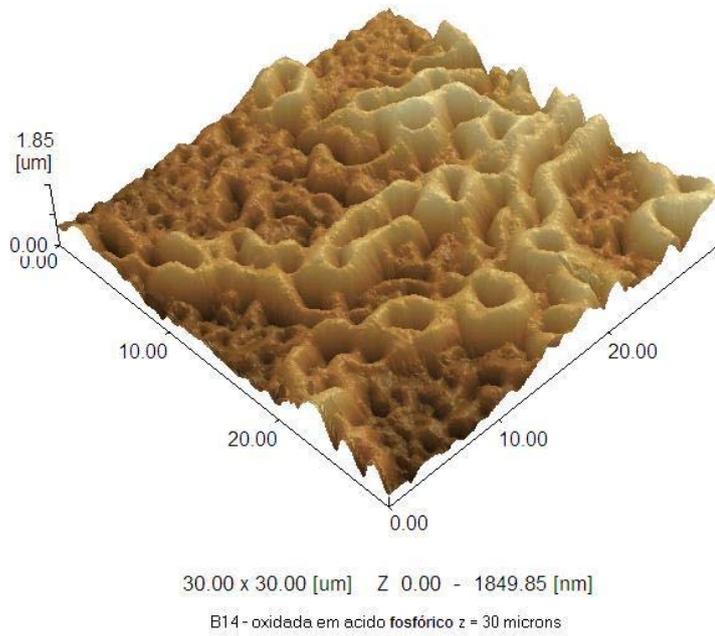


Figura 24: Imagem de AFM da superfície tratada por  $H_3PO_4$  -200V.

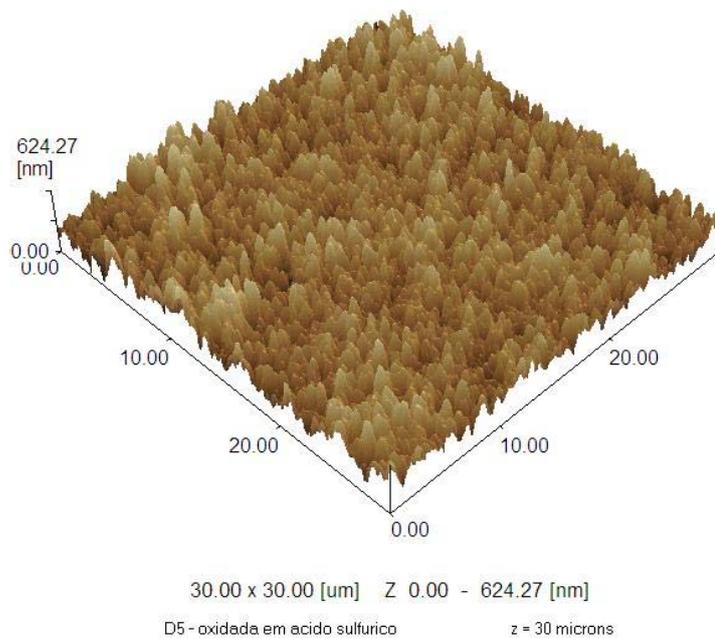


Figura 25: Imagem de AFM da superfície tratada por  $H_2SO_4$  -150V.

- **Difração de Raios-X (DRX)**

As Figuras 26 e 27 mostram os difratogramas obtidos. As amostras tratadas com  $H_3PO_4$  mostram que o filme é muito fino ou amorfo, pois só é possível ver picos de titânio. A investigação por DRX mostrou que o filme da superfície tratada com  $H_2SO_4$  apresenta uma fase rutilo e outra anatásio, sendo a primeira em maior intensidade (Figura 28).

Este resultado corrobora o trabalho de XIONG e colaboradores (2004) que mostrou que o aumento do potencial e concentração de  $H_2SO_4$  diminuiu a fase anatásio, aumentando significativamente a fase rutilo no filme.

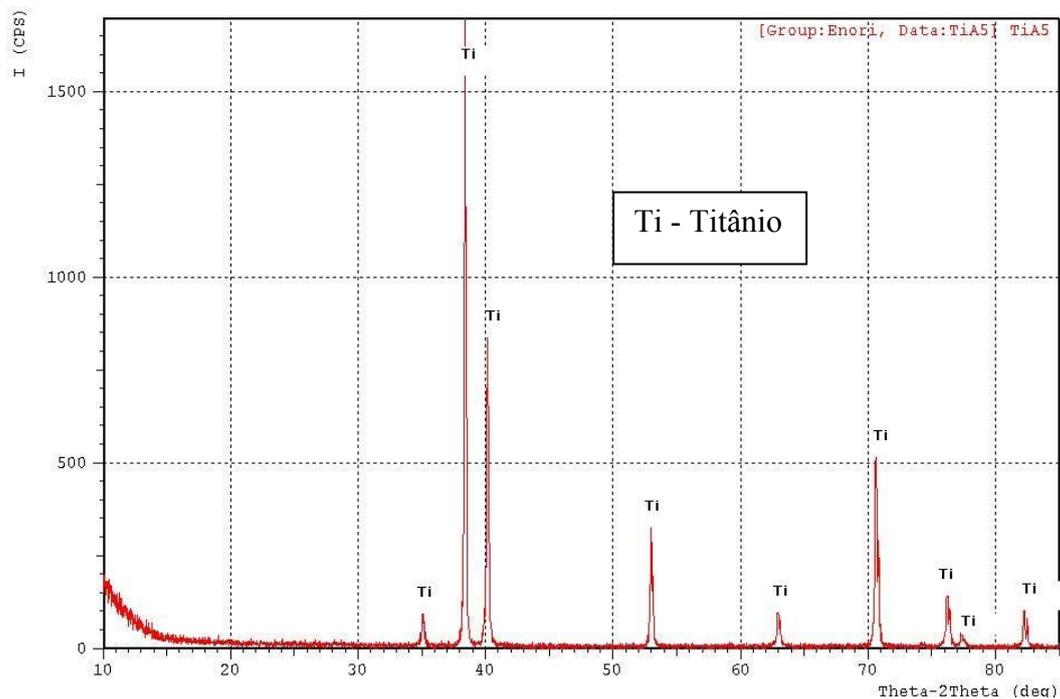


Figura 26: Difratograma de raios-X da amostra tratada com  $H_3PO_4$  a 50V

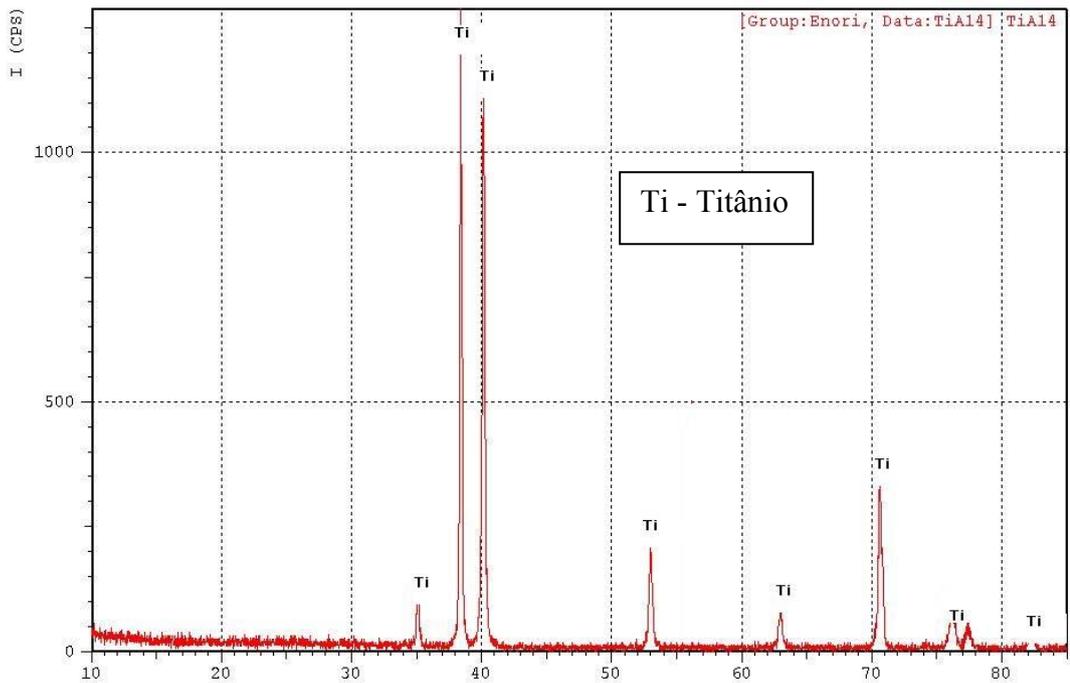


Figura 27: Difratoograma de raios-X da amostra tratada com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 200V.

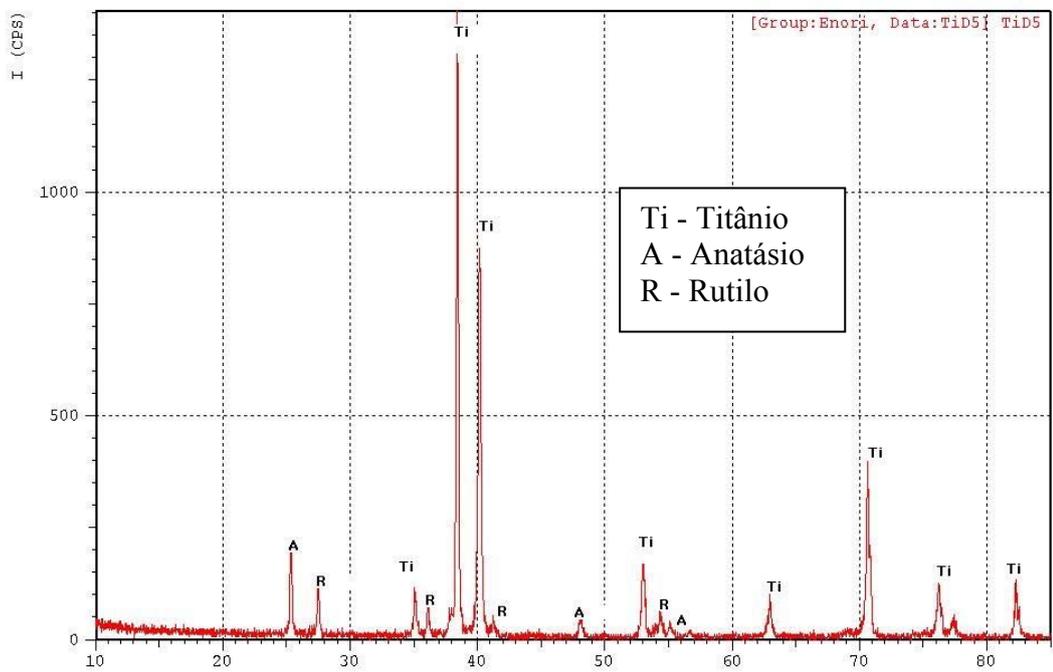


Fig 28: Difratoograma de raios-X da amostra tratada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 150V.

Alguns autores relatam que camadas porosas de óxido de Ti produzidas por anodização e compostas principalmente de fases anatásio e rutilo podem apresentar grande habilidade de formação de apatita sobre a superfície. Ao contrário, nas superfícies com pouca ou nenhuma presença de fase amorfa de Ti uma menor formação de apatita foi observada em testes de bioatividade de 3 dias (KAWASHITA *et al.*, 2004; XIONG *et al.*, 2004). Superfícies que apresentaram camadas de óxido de Ti formadas por anodização em ácido sulfúrico constituídas somente pela fase rutilo foram mais eficientes nos testes de bioatividade em 3 dias, apresentando grande quantidade de apatita formada (XIONG *et al.*, 2004).

- **Avaliação da carga de superfície**

O objetivo do método é inferir a quantidade de cristal violeta total associada às placas de titânio. O valor para a água foi zero unidade arbitrária (ua) e para o corante foi 2,834 ua.

A superfície anodizada com  $H_3PO_4$  é muito pouco carregada pois absorve apenas 0,02%, enquanto que a de  $H_2SO_4$  sugere ser negativamente carregada devido à adsorção de 47% do corante que sabemos ser carregado positivamente.

Tabela 8: Absorbância de cristal violeta às superfícies anodizadas.

	<b>Absorbância (u.a.)</b>	<b>Porcentagem</b>
Controle – (água)	0	0
Total (cristal violeta)	2,83	100
$H_3PO_4$ (200V)	0,02	<b>0,7</b>
$H_2SO_4$ (150V)	1,33	<b>47</b>

- **Avaliação da adsorção de fibronectina à superfícies de titânio**

Os resultados de leitura de absorvância de fibronectina ( $10\mu\text{g.ml}^{-1}$ ), às superfícies é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9: Adsorção de fibronectina a superfície de titânio anodizadas ou não

<b>Tratamentos das superfícies</b>	<b>Absorvância (u.a.)</b>	<b>Porcentagem</b>
<b>Controle – (PBS)</b>	0	0
<b>Controle + (FN)</b>	1,02	100
<b>A- <math>\text{H}_3\text{PO}_4</math> (50V)</b>	0,14	14
<b>B- <math>\text{H}_3\text{PO}_4</math> (200V)</b>	0,39	39
<b>C- <math>\text{H}_2\text{SO}_4</math> (150V)</b>	0,68*	68

O resultado mostra que 68% da fibronectina da solução foram adsorvidas na superfície C. Enquanto que nas outras duas superfícies A e B onde usamos o eletrólito  $\text{H}_3\text{PO}_4$  tivemos menos de 40%. Fato que confirma o resultado anteriormente descrito, onde a superfície C negativamente carregada atrai a FN que é positivamente carregada.

- **Cultivo e adesão de osteoblastos**

O resultado quantitativo da adesão celular encontra-se representado na Tabela 8, assim como a porcentagem de adesão/área tratada. A porcentagem de adesão foi estimada através do total de células aderidas dentro da área da superfície com tratamento (círculo).

Tabela 8: Quantidade de células aderidas nos diferentes tratamentos de superfície ao longo do tempo.

Tempo	Tratamento	CPMA	Adesao (%)
30'	H3PO4-50V	13250,24	50
	H3PO4-200V	9943,68	38
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150V	10946,57	41
90'	H3PO4-50V	22753,16	86
	H3PO4-200V	19366,8	73
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150V	15898,76	60
120'	H3PO4-50V	11105,38	42
	H3PO4-200V	11107,14	42
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -150V	24020,7	91
	Plástico (Ctr+)	33072,51	-
Total	Solução	26493,66	100

A superfície tratada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mostrou uma porcentagem de adesão celular crescente ao longo do tempo, enquanto que as outras duas superfícies tratadas com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> tiveram uma diminuição no total de células HOB aderidas após 120 minutos (Figura 29).

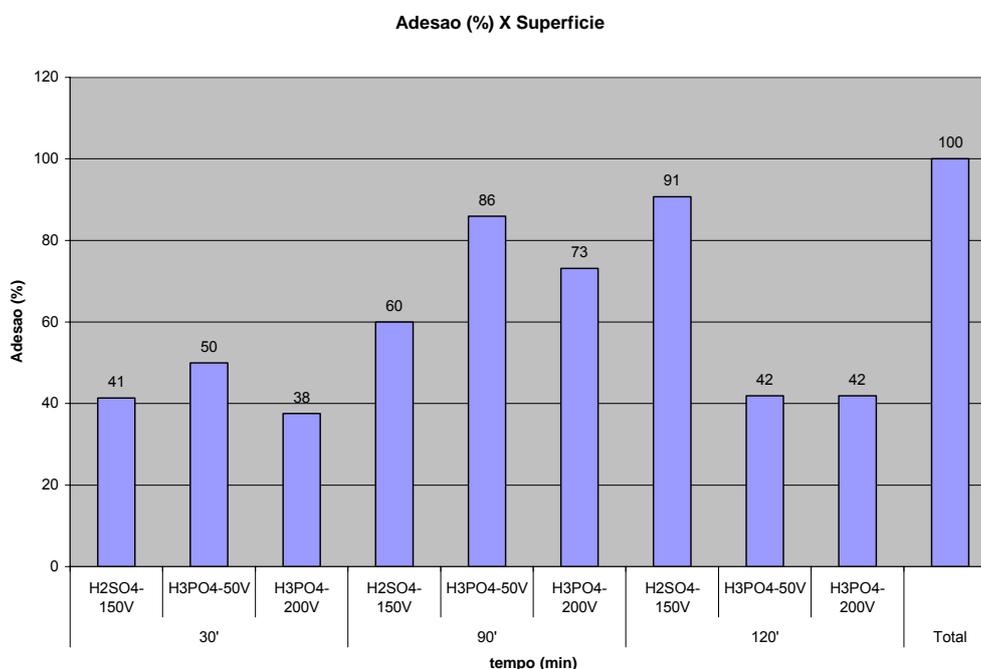


Figura 29: Gráfico mostrando a porcentagem de adesão dos osteoblastos em cada tratamento, em função do tempo.

## 5.2 Resultados da fase experimental 2

Na segunda fase do trabalho, o objetivo foi analisar as propriedades da camada de óxido após os tratamentos de superfície com os diferentes eletrólitos e, correlacionar as propriedades de superfície do material com o processo de adesão de osteoblastos humanos.

Os grupos de estudo foram divididos em:

Grupo A: Ti-cp anodizado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  de 1,4 M,  $t = 60\text{s}$ , 200 V;

Grupo B: Ti-cp anodizado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 0,5 M,  $t = 60\text{ s}$ , 150 V;

Grupo C: Controle = Ti-cp sem tratamento.

- **Microscopia eletrônica de varredura**

A Figura 30 mostra as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filmes anódicos produzidos sobre os substratos de Ti-cp em comparação com o titânio polido.

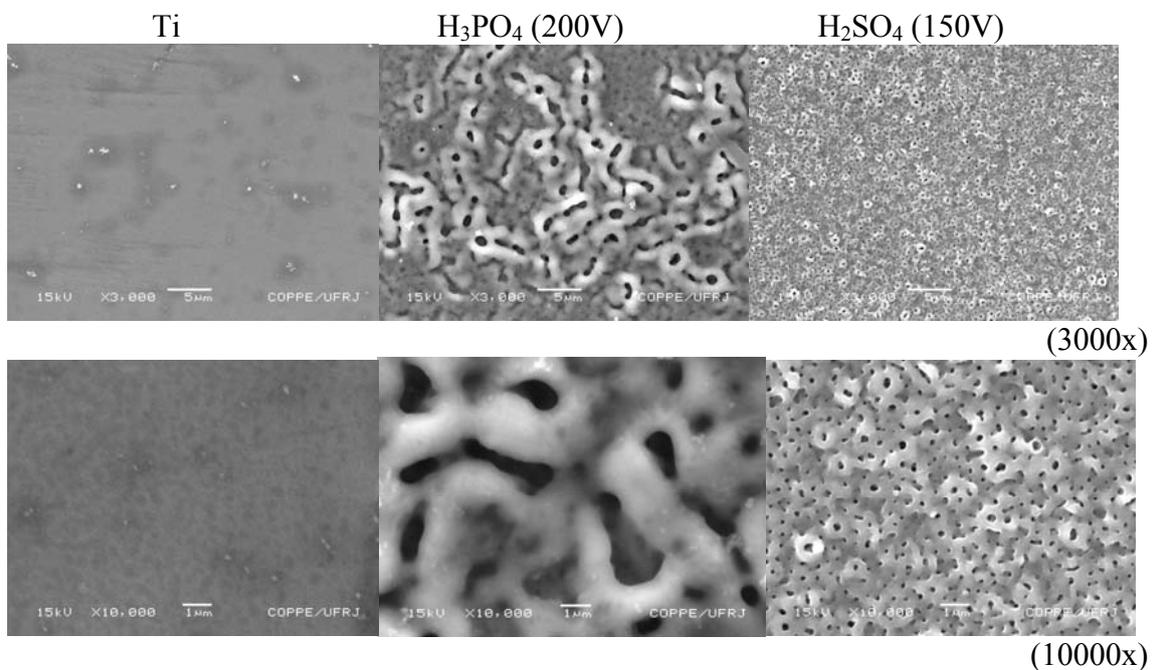


Figura 30: Micrografias (MEV) das superfícies de Ti-cp polido e Ti-cp anodizado.

Corroborando os resultados encontrados da fase 1, as micrografias mostraram uma diferença no tamanho e quantidade de poros nas superfícies tratadas com os diferentes eletrólitos. As amostras anodizadas com  $H_2SO_4$  apresentaram uma maior formação de poros quando comparadas com a superfície anodizada com  $H_3PO_4$ , além de esses poros serem de menor tamanho.

- **Microanálise por energia dispersiva (EDS)**

As Figuras 31 e 32 mostram os espectros obtidos pela espectroscopia por dispersão de energia. Os resultados informaram a presença de fósforo (P) e enxofre (S) nas superfícies tratadas com  $H_3PO_4$  e  $H_2SO_4$ , respectivamente.

Os elementos encontrados devem ser provenientes do tratamento de anodização utilizado sobre a superfície de titânio.

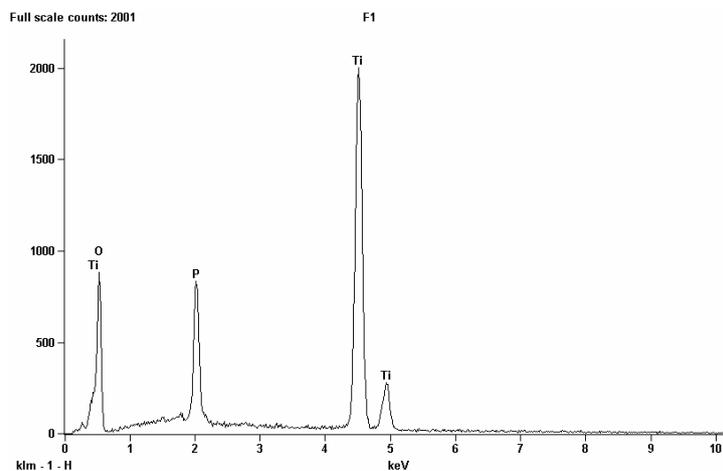


Figura 31: Espectro de EDS das amostras de Ti-cp anodizado com 1,4M  $H_3PO_4$  200V.

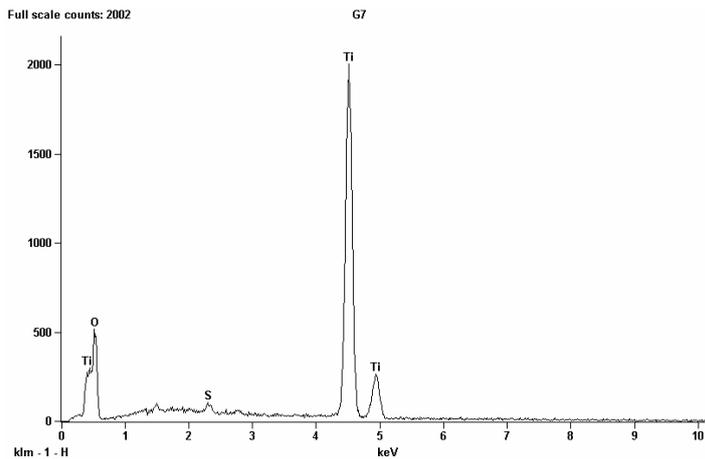


Figura 32: Espectro de EDS das amostras de Ti-cp anodizado com 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 150V.

- **Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS)**

As duas superfícies analisadas mostraram a presença de titânio e oxigênio. O carbono e o nitrogênio foram detectados e considerados contaminantes de superfície. A presença de carbono em espectros de XPS é comumente verificada devido a contaminação das amostras por ser adsorvido do ar, assim como, a presença de nitrogênio como contaminante não é raro.

O tratamento com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> mostrou a presença de ânions de fósforo (P), com pico de 6,76%, eletroquimicamente incorporados à matriz de TiO<sub>2</sub> (Figura 33).

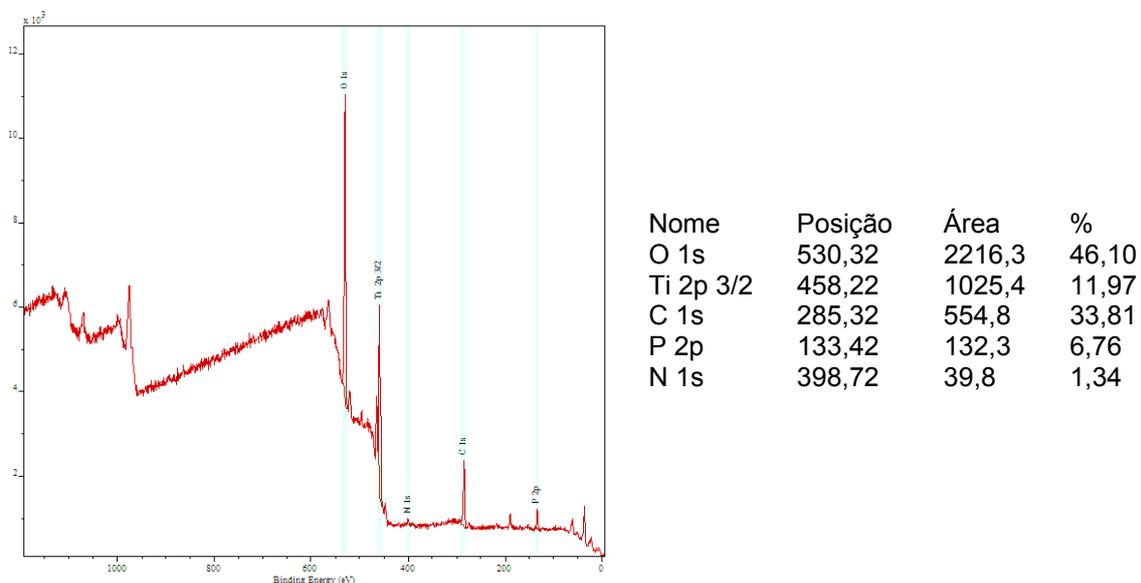


Figura 33: Espectro global de XPS para a superfície tratada com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (200V).

No gráfico de deconvolução do pico de titânio (Figura 34) observou-se o predomínio quase que total de  $\text{TiO}_2$  (98,2%).

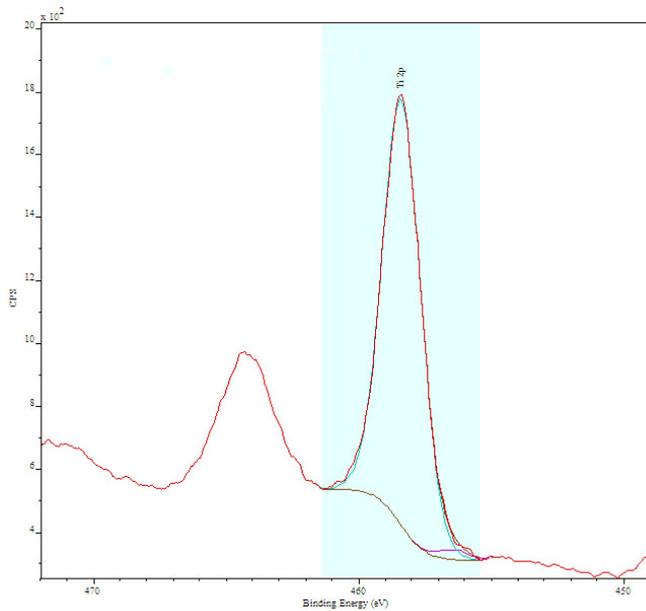
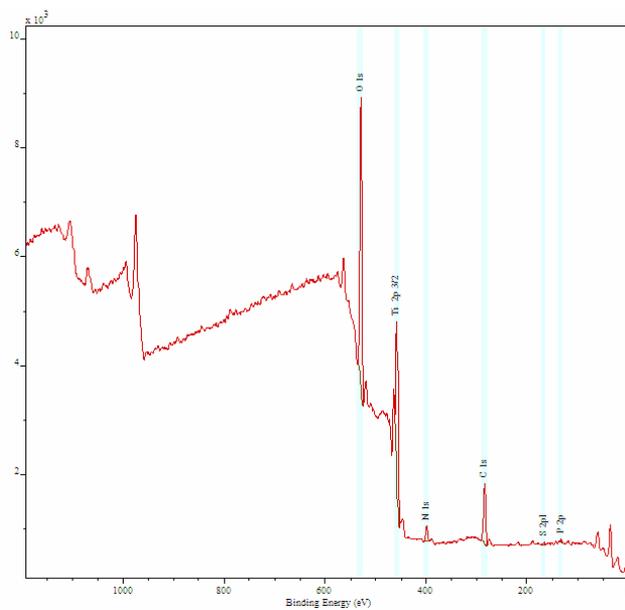


Figura 34: Deconvolução do titânio tratado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (200V).

A superfície tratada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  contém ânions de enxofre (S) incorporados eletroquimicamente à matriz do  $\text{TiO}_2$  (Figura 35).



Nome	Posição	Área	%
O 1s	529,73	2269,70	48,24
Ti 2p 3/2	457,63	1033,9	12,33
C 1s	284,73	545,1	33,94
P 2p	131,43	17,5	0,91
N 1s	399,53	114,6	3,96
S 2p1	167,13	15,9	0,58

Figura 35: Espectro de XPS para a superfície tratada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (150V).

O espectro referente ao Ti 2p apresenta novamente a presença de TiO<sub>2</sub> (Figura 36). Ombros no nível de energia próximo a 455eV normalmente são associados a presença de TiO (SUL,2002).

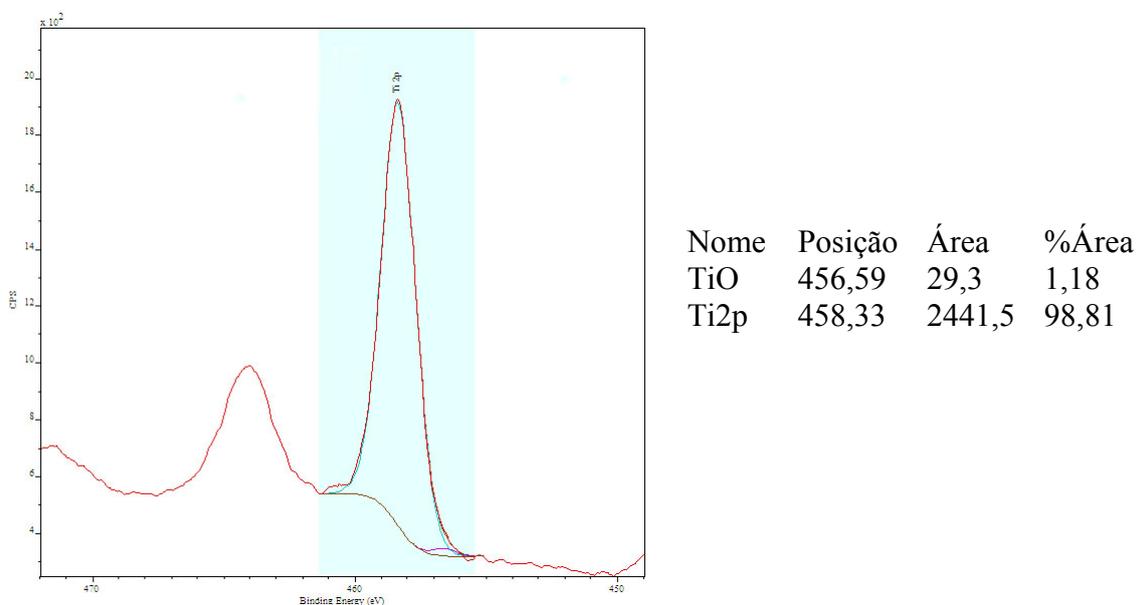


Figura 36: Deconvolução do titânio tratado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (200V).

- **Ângulo de contato ( $\theta$ )**

O valor médio de  $\theta$  e seu desvio padrão para cada um dos tratamentos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Medidas de ângulo de contato (média  $\pm$  desvio padrão) das superfícies em água, álcool etílico e glicerol

Superfícies	Líquidos		
	Água	Álcool Etílico (5mol/l)	Glicerol
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (200V)	43,2 $\pm$ 10,0	48,0 $\pm$ 6,7	32,1 $\pm$ 6,0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (150V)	32,9 $\pm$ 7,3	31,1 $\pm$ 3,0	95,9 $\pm$ 10,9

Comparativamente, a superfície anodizada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V) é mais hidrofílica do que a com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (200V), por apresentar menor ângulo de contato na água.

- **Energia de superfície**

Os valores medidos de energia de superfície das amostras estudadas mostrou que as superfícies possuem hidrofílicidade semelhantes, independente do tratamento. Porém, a componente dispersiva da tensão superficial foi estatisticamente maior para a superfície tratada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V). Alguns autores associam a componente dispersiva com uma maior adesão celular por ser ela a responsável pela retenção da molécula (SANTIAGO, 2004).

Tabela 11: Medidas de energia de superfície das superfícies estudadas (mJ/m<sup>2</sup>).

Superfícies	$\gamma_s$	$\gamma_s^p$	$\gamma_s^d$
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (200V)	58,8	53,6	5,1
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (150V)	62,2	49,4	12,8

- **Avaliação da porcentagem de osteoblastos aderidos**

O cultivo das células seguiu o mesmo protocolo descrito no método de cultivo e adesão de osteoblastos.

Para quantificar a adesão celular às superfícies recobertas a concentração celular da suspensão foi estimada por contagem hematimétrica e preparadas para uma concentração final de  $5,0 \times 10^5$  células/ amostra (gota de 114  $\mu$ L por amostra).

No segundo ensaio a contagem celular foi realizada usando 4 tempos: 30, 90, 120, 240 minutos.

Tabela 12: Porcentagem de células HOB aderidas nos diferentes substratos em função do tempo.

Tempo	Tratamento	Adesao (%)	desvio padrao(%)
30'	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	58	36,84
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	53	24,29
	Ti cp	29	0,81
90'	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	75	11,82
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	75	2,37
	Ti cp	16	20,52
120'	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	62	11,31
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	45	2,34
	Ti cp	28	1,67
240'	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	61	39,90
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	33	2,03
	Ti cp	14	1,47
	Total	100	

Nos primeiros 90 minutos há um aumento significativo da porcentagem de células aderidas ao substrato, com exceção do Ti-cp onde houve uma diminuição. Porém se for considerado o desvio padrão, podemos sugerir também um aumento nesta superfície.

Em todos os tempos, as células mostraram uma preferência por superfícies tratadas por anodização, onde o número de células aderidas foi comparativamente superior, em relação ao titânio polido (Figura 37 e 38).

Com o aumento do tempo, observou-se um comportamento celular superior nos substratos anodizados por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

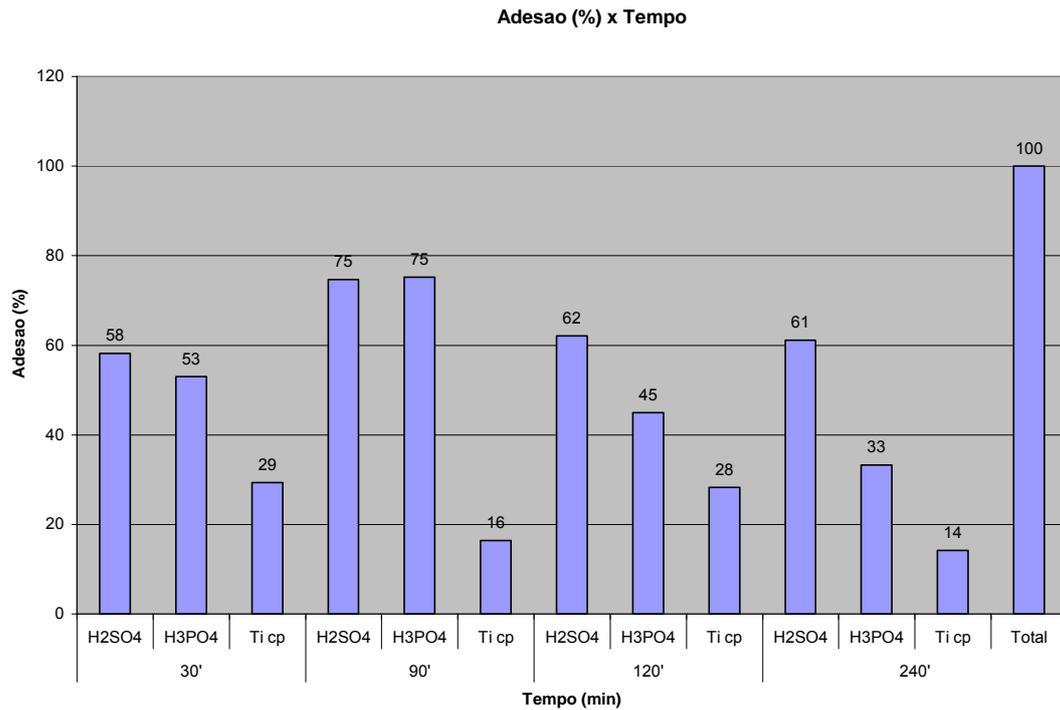


Figura 37: Gráfico representativo da porcentagem de adesão de células HOB nos diferentes eletrólitos em função do tempo.

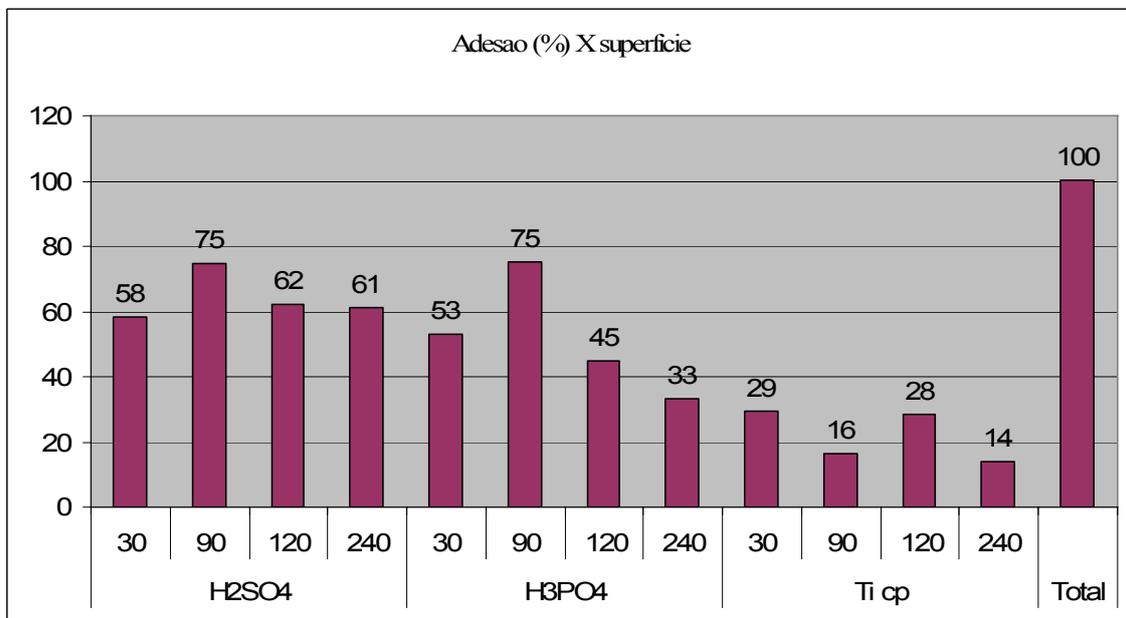


Figura 38: Gráfico representativo da porcentagem de células aderidas em função dos tratamentos utilizados.

### Adsorção de fibronectina

A análise realizada por contagem hematimétrica revelou que a presença da FN na superfície melhora a adesão de osteoblastos em relação ao número (Tabela 13) e porcentagem (Tabela 14) de células aderidas.

Tabela 13: Número de células aderidas em relação ao tempo.

<b>FN</b>	<b>30'</b>	<b>120'</b>	<b>240'</b>
+	$7,7 \pm 2,3$	$3,6 \pm 1,2$	$5,3 \pm 3,3$
-	$3 \pm 1$	$2,6 \pm 1,5$	$0,3 \pm 0,5$

Tabela 14: Pocercentage de células aderidas em relação ao tempo.

<b>FN</b>	<b>30'</b>	<b>120'</b>	<b>240'</b>
+	$58,8 \pm 18$	$27,7 \pm 9,5$	$40,4 \pm 25$
-	$23 \pm 7,6$	$20 \pm 11$	$2,5 \pm 4,4$

A análise das micrografias do MEV mostrou que as superfícies com FN adsorvida, tiveram um número de célula estatisticamente maior no período de 4 horas (Tabela 15). A morfologia das células também mostrou diferença significativa. Com o aumento do tempo estudado, as células mostravam aumento de prolongamentos citoplasmáticos e maior espraiamento (Figura 39).

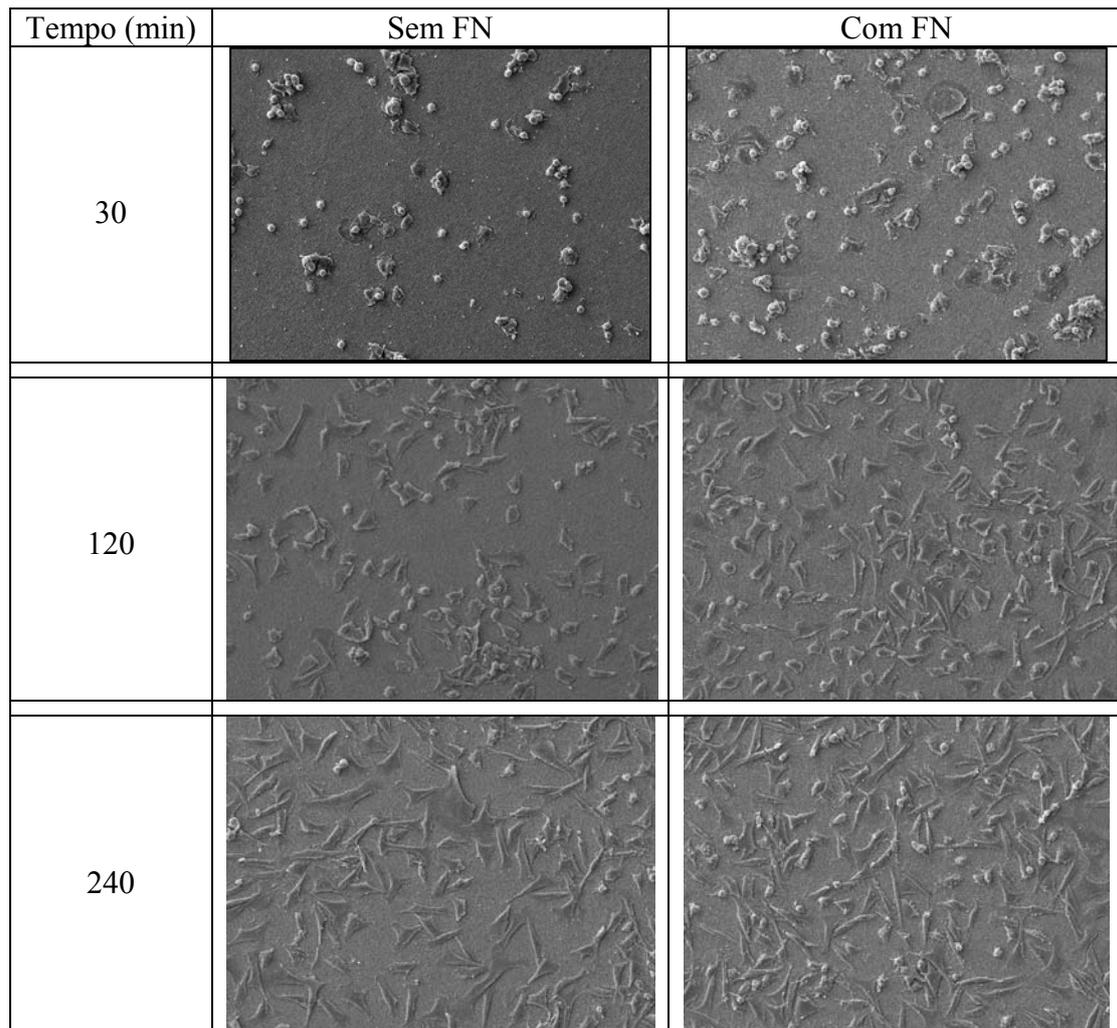


Figura 39: Micrografias de MEV da cultura de osteoblastos sobre as superfícies recobertas ou não com FN nos diferentes tempos estudados (300x).

A Figura 40 mostra em maior aumento os lamelipodios do osteoblasto quando entra em contato com a superfície e a descontinuidade do filme de FN (Fig. 40b).

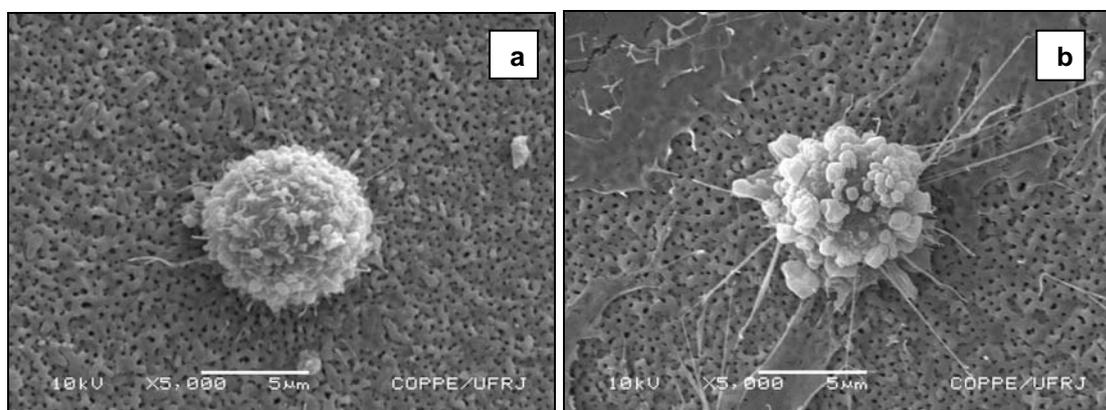


Figura 40: Osteoblasto aderido a superfície anodizada de Ti após 30min: sem FN (a) e com FN adsorvida (b) no aumento de 3000x.

Tabela 15: Distribuição do número de células e suas respectivas áreas nas superfícies com e sem a adsorção de FN nos diferentes tempos.

Tempo(min)	FN	N. células	Área media	Desv. padrão	Mínimo.	Maximo
30'	-	70	114,49	78,55	30	331
	+	87	206,68	147,96	45	683
120'	-	157	209,82	97,25	40	518
	+	122	124,15	81,63	28	576
240'	-	83	354,81	175,00	107	851
	+	162	264,61	151,23	62	841

A Figura 41 mostra o momento de espraiamento celular e sua divisão. Antes da adesão, há uma adsorção à superfície e a emissão de prolongamentos citoplasmáticos e lamelipódios.

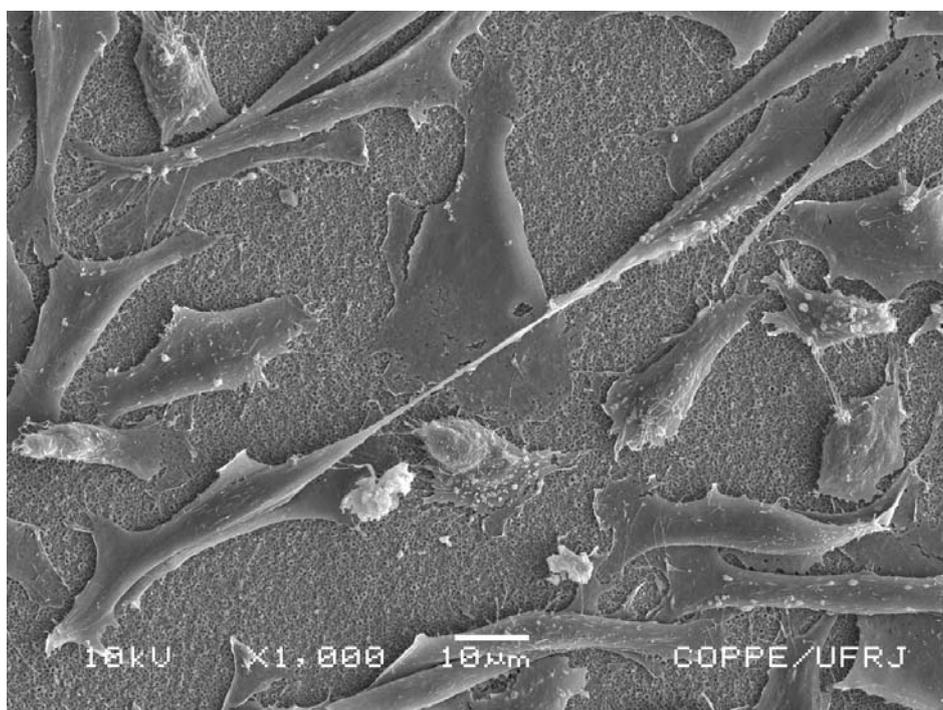


Figura 41: Cultura de osteoblastos no tempo de 120' sobre a superfície de Ti anodizado.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biocompatibilidade do implante está relacionada com o comportamento da célula em contato com ele e a adesão celular a sua superfície. Sabe-se que a topografia da superfície pode influenciar esta resposta biológica (HANEIN,1993; ANSELME, 2000, LANGE, 2002;. ANSELME & BIGERELLE, 2005).

As micrografias de MEV mostram que as configurações dos poros dos filmes de óxido de titânio variam com a composição e concentração do eletrólito, e com o potencial aplicado. As superfícies de  $H_2SO_4$  (150V) apresentam morfologia aparentemente mais regular que a de  $H_3PO_4$  (200V) apesar de estarem numa faixa de rugosidade próxima.

O número de poros foi maior com o aumento do potencial utilizado. Zhu *et al* (2004) também mostraram no seu estudo, uma influência da anodização anódica no aumento da rugosidade em função da voltagem aplicada, onde o aumento do potencial aplicado gerou um aumento na porosidade.

Existiu significância estatística entre as condições de anodização com relação a sua rugosidade média. O aumento da voltagem nas superfícies anodizadas com  $H_3PO_4$  gerou um aumento da rugosidade da superfície e conseqüente aumento do número de poros.

Segundo a literatura, osteoblastos são mais sensíveis à organização e a morfologia da rugosidade do que a sua amplitude (ANSELME, 2005; ZINGER *et al.*, 2004, 2005) Superfícies numa mesma faixa de rugosidade podem apresentar micromorfologias diferentes.

A adesão celular também é afetada pelas propriedades químicas do substrato. Modificações na carga, hidrofobicidade e hidroflicidade da superfície, mostraram

alterar a capacidade de adesão da célula. (HANEIN,1993; ANSELME, 2000 PFEIFFER *et al.*, 2003).

O tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V) apresentou menor ângulo em contato com a água, mostrando ser mais hidrofílico comparativamente com os outros substratos, logo possui uma maior molhabilidade. Também mostrou ser mais carregada, porém necessitamos de estudos mais precisos para determinar esta carga (HIMENO, 2002). Sabe-se que células aderem melhor em superfícies hidrofílicas (ANSELME, 2000, ZHU, 2004).

Os osteoblastos tiveram a adsorção inicial semelhante nos dois tratamentos. Depois de 90 minutos eles se mantiveram aderidos na superfície com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V), enquanto que na de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (200V), houve um desprendimento das células, não completando sua adesão. A porcentagem de células aderidas foi maior no primeiro que no segundo, e ambos maiores que no titânio polido.

Os resultados sugerem uma preferência celular pela superfície anodizada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V). As propriedades físicas e químicas apresentadas por este filme também nos sugere que o mesmo possua características compatíveis com uma melhor resposta biológica, direcionando a escolha do mesmo para trabalhos futuros.

## 7 CONCLUSÕES

A análise do efeito da anodização da superfície de placa de titânio puro na adesão de osteoblastos humanos permitiu chegar as seguintes conclusões:

- A morfologia da superfície é influenciada pelo eletrólito utilizado. Superfícies tratadas com  $H_2SO_4$  (200V) mostraram porosidade e rugosidade maiores que as tratadas com  $H_3PO_4$  (50V e 150V).
- Em relação ao eletrólito  $H_3PO_4$ , o número de poros foi diretamente proporcional e o tamanho dos poros foi inversamente proporcional ao aumento do potencial aplicado.
- Superfícies tratadas com  $H_2SO_4$  (0,5M; 200V) adsorvem mais fibronectina e isso provavelmente se deve ao fato de ser negativamente carregada atraindo a FN que é positivamente carregada.
- Os osteoblastos humanos após 4 horas de adesão sobre as superfícies tratadas de titânio mostraram uma porcentagem de adesão e número de células maior nas superfícies anodizadas com  $H_2SO_4$ .
- Os osteoblastos sugerem uma preferência por superfícies hidrofílicas, com menor ângulo de contato e com maior energia de superfície.
- A adsorção de FN mostrou ser efetiva na adesão de osteoblastos não apenas nos momentos iniciais de adsorção celular, mas também em tempos maiores de adesão e fixação da célula.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

→ Estudar a interação específica de proteínas da membrana celular dos osteoblastos com a superfície de Ti anodizada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V) usando técnicas de imunomarcação.

→ Comparar o efeito da química, topografia e morfologia das superfícies tratadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (150V) sobre o comportamento a longo prazo dos osteoblastos até seu estágio de mineralização.

→ Realizar experimentos *in vivo* para avaliar as melhores condições de anodização em que ocorra osseointegração mais rápida.

→ Avaliar o efeito de outros tipos de tratamentos na superfície do Ti, sobre o comportamento de osteoblastos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD et al, 1999, “Differential response of human osteoblast-like cells to commercially pure (cp) titanium grades 1 and 4”. *J. Biomed. Mater Research*; v. 46, pp.121-131.
- ALBREKTSSON, T. et al, 1983, “The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implants in bone”. *Ann. Biomed. Eng.*, v. 11, pp. 1-27.
- ANSELME, K., 2000, “Osteoblast adhesion on biomaterials”. *Biomaterials*, v. 21, n.7 pp. 667-681.
- ANSELME, K., BIRELLE, M., 2005, “Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion”. *Acta Biomaterialia*, n. 1, pp.211-222.
- ASTM F67, 1998, “Standart Specifications for Ti6Al4V alloy casting for surgical implants”, pp. 1108-1188.
- BACACOVA, et al., 2001, “Polishing and coating carbon fiber-reinforced carbon composites with carbon-titanium layer enhances adhesion and grow of osteoblasts-like MG63 cells”. *J. Biomed Mater Res*, v. 54, pp. 567-578.
- BASTOS, I.N., VANZILLOTA, P.S., SOARES, G.A., 2003, “Caracterização morfológica e tropográfica da superfície de implantes dentários”. *RBO*, v. 60, pp.47-50.
- BIGERELLE, M et al., 2002, “Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response”. *Biomaterials*, v. 23, pp. 1563-1577.
- BELOTI, MM, BELLESINI, LS, ROSA, AL., 2005. “The effect of purmorphamine on osteoblast phenotype expression of human bone marrow mesenchymal cells cultured on titanium”. *Biomaterials*, v. 26, Issue 20 (Jul), pp. 4245-4248.

- BESS, E. *et al.*, 1999, "Protein adsorption and osteoblast responses to heat-treated titanium surfaces". *Implant Dent.*, v. 8, n.2, pp. 126-132.
- BLUMBERG, P.M., ROBBINS, P.W., 1975, "Effect of proteases on activation of resting chick embryo fibroblasts and on cell surface proteins". *Cell*, n. 6, pp. 137-147.
- BORSARI, V., 2005, "Comparative in vitro study on a ultra-high roughness and dense titanium coating". *Biomaterials*, v. 26, Issue 24 (Aug), pp. 4948-4955.
- BRÅNEMARK, P.I., HANSSON, B.O, ADELL, R., BREINE, U., LINDSTRÖM, U., HALLÉN, O., ÖMAN, A., 1977, "Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period". *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, v. 16, pp.7-127.
- BOYAN, BD *et al.*, 1996, "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response". *Biomaterials*, v. 17, pp.137-46.
- BURKARTER, E., 2006, "Construção de imagens por padrões Hidrofóbicos/Hidrofílico". Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- CACCIAFFESTA, P. *et al.* , 2001, "Visualisation of human plasma fibrinogen adsorbed on titanium implant surfaces with different roughness". *Surface science*, v. 491, pp. 405-420.
- CALLISTER, JR, W.D., 2002. "Propriedade Mecânica dos metais". In: LTC (eds) "*Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*", 4 ed., cap. 6, Rio de Janeiro, LTC.
- CASALETTO, M.P., INGO, G.M., KACIULIS, S., MATTOGNO, G., PANDOLFI, L., SCAVIA, G., 2001, "Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings", *App. Surf. Sci.*, v. 172, pp.167-177.

- CILIBERTO, E., SPOTO, G., 1997. "Fluorapatite coatings by metal organic chemical vapor deposition", *Chem Commun*, v.16, pp. 1483-1484..
- CHOI, J.R.B., WEHRSPORN, J. LEE, GOSELE, U., 2004, *Electrochim. Acta*, v. 49, pp. 2645.
- CRUZ, TG, 2000. "Leis de Escala e Dimensão Fractal em Filmes Finos: Microscopia de Força Atômica e Voltametria Cíclica". *Revista Physicae*, v.1, pp. 29-36.
- DIENER, A., 2005, "Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics". *Biomaterials*, v. 26, Issue 4, February, pp. 383-392.
- Di PALMA, F. et al.2005, "Modulation of the responses of human osteoblast-like cells to physiologic mechanical strains by biomaterial surfaces". *Biomaterials*, v.26, pp. 4249–4257.
- FENG, B. *et al.*, 2002. "Characterization of titanium surfaces with calcium and phosphate and osteoblast adhesion". *Biomaterials*.
- FENG, B. *et al.* , 2003, "Characterization of surface oxide film on titanium and adhesion of osteoblast". *Biomaterials*, v. 24, pp. 4663-4670.
- FIOCRUZ, 2006. [www.invivo.fiocruz.br](http://www.invivo.fiocruz.br) último acesso Janeiro.
- FOWKES, F.M, ,1964. *Ind. Eng. Chem.* v. 56, pp. 40.
- FOWKES, F.M., 1983 in: *Physicochemical Aspects of Polymer Surfaces*, Ed: K.L. Mittal, v. 2, pp. 583, Plenum Press, New York.
- FROSCH, K.H. *et al.*, 2003, "Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants". *Journal of orthopaedic research*, v. 21, pp. 213-223.
- HANAWA, T. *et al.*, 1997, "Surface modification of titanium in calcium-ion-containing solutions". *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 34, pp. 273-278.

- HANEIN, D *et al.*, 1993, "Selective interaction of cells with crystal surfaces. Implications for the mechanism of cell adhesion". *Journal of Cell Science*, v. 104, pp.275-288.
- HAUTANEN A., KESKI-OJA J., 1983, "Interaction of fibronectin with complement component C3". *Scand J Immunol*, v. 17, pp. 225-30.
- HEALY, E. K., DUCHEYNE, P., 1992, "Hydration and preferential molecular adsorption on titanium in vitro". *Biomaterials*, v.13, n. 8.
- HIMENO, T. *et al.*, 2002, "Zeta-potential variation of bioactive titanium metal during apatite formation on its surface in simulated body fluid". *Key engineering material*, vols. 218-220, pp.641-644.
- KASEMO, B., LAUSMAA, J. 1991, "The bone-biomaterial interface". In: Davies, J.E.(ed), pp.19-32.
- KESELOWSKY *et al*, 2005, "Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation". *PNAS*, v. 102, n.17, pp. 5953-5957.
- KESHMIRI, M.; TROCZYNSKI, T., 2003, "Apatite formation on TiO<sub>2</sub> anatase microspheres". *J. Non-Cryst. Sol.*, v. 324, pp.289-294.
- KIM, Y. *et al.* , 2004, "Microarray – based expression analysis of human osteoblast-like cell response to anodized titanium surface". *Biotechnology Letters*, v.26, pp. 399-402.
- KIM, S.E., LIM, JH; LEE, SC; CHOI, J., 2008., "Anodically nanostructured titanium oxides for implant applications". *Electrochimica Acta*, v.53, pp. 4846–4851.
- KIRBS, A. *et al.*, 2003a,"Methods for the physical and chemical characterization of surfaces of titanium implants". *Materials science and engineering C*, v. 23, pp.425-429.

- KIRBS, A. *et al.* 2003b, “On the description of the fractal nature of microstructured surfaces of titanium implants”. *Materials Science and Engineering: C*, v. 23, Issue 3, March, pp.413-418.
- KOKUBO, T. *et al.*, 2004, “Bioactive metals: preparation and properties”. *Journal of materials science: materials in medicine*, v.15, pp. 99-107.
- LAHAW J., SCHWARTZ M.A., HYNES R.O., 1982, “Analysis of platelet adhesion with a radioactive chemical crosslinking reagent: interaction of thrombospondin with fibronectin and collagen”. *Cell*, v. 31, pp. 253-262.
- LÄNGE, K. *et al.*, 2004, “Investigation of initial formation on modified titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) surfaces by reflectometric interference spectroscopy (RLFS) in a model system”. *Dental materials*, v. 20, pp. 814-822.
- LANGE, R. *et al.*, 2002, “Cell extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristic of titanium surfaces depend on the roughness of the material”. *Biomolecular Engineering*, v. 19, pp.255-261.
- LAUSMAA, J., 1996, “Surface spectroscopic characterization of titanium implant materials”. *J. Elect. Spect. Rel. Phen.*, v. 81, pp.343-361.
- Y.-L. LEE *et al.*, 2000, “Surface characterization of the monolayer and Langmuir-Blodgett films of tetra-tert-butyl-copper phthalocyanine”. *Thin Solid Films*, v. 370, pp. 278-284.
- LIANG, B. *et al.*, 2003. “Histological and mechanical investigation of the bone – bonding ability of anodically oxidized titanium in rabbits”. *Biomaterials*, v. 24, pp. 4959-4966.
- LIU, X., CHU, P. DING, C., 2004, “Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications”. *Materials science and engineering*, v. 47, pp. 49-121.

- LIU, XIAOMEI *et al.*, 2007, “Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro”. *Biomaterials*, v. 28, pp. 4535–4550.
- LLOYD, C.H. *et al.*, 1997, “Dental Materials: 1995 literature review”. *Journal of dentistry*, v. 25, n. 3-4, pp. 173-208.
- LÜTHEN, F. *et al.*, 2005, “The influence of surface roughness of titanium on  $\beta$ -1 and  $\beta$ -integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells”. *Biomaterials*, v. 26, pp. 2423-2440.
- MALISKA, A. , 2005, “Microscopia eletrônica de varredura”. Universidade Federal de Santa Catarina.
- MENZEL E.J., SMOLEN J.S., LIOTTA L., REID K.B., 1981, “Interaction of fibronectin with C1q and its collagen-like fragment (CLF)”. *FEBS Lett*, v. 129, pp. 188-192
- MENEZES, G. C., 2003, *A interação de osteoblastos humanos com filmes de fibronectina plasmática humana constituídos sob diferentes condições de pH*. Tese de mestrado, UFRJ/RJ, Rio de Janeiro, Brasil.
- MIYAMOTO S., KATZ B.Z., LAFRENIE R.M., YAMADA K.M., 1998, “Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis”. *Ann NY Acad Sci*, v. 857, pp. 119-112.
- MONCADA, A.C., 1995, *Caracterização de superfícies de titânio cp grau I após diferentes tratamentos*. Tese de doutorado, Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, Bauru, SP, Brasil.
- NISHIGUCHI, S. *et al.*, 1999, “The effect of heat treatment on bone-bonding ability of alkali treated titanium”. *Biomaterials*, v. 20, pp. 491-500.

- OLIVEIRA, P.T, NANCI, A., 2004, "Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells". *Biomaterials*, v. 25, Issue 3, February, pp. 403-413.
- PARR, G.R., GARDNER, L.K., TOTH, R.W., 1985, "Titanium: the mystery metal of implant dentistry; dental materials aspects". *J. Prosth. Dent.*, v. 54, pp. 410-414.
- PFEIFFER, F. et al., 2003, "Cell reaction to microstructured implant surfaces". *Microelectronic Engineering*, v. 67-68, pp. 913-922.
- PONSONNET, L. et al., 2003, "Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior". *Materials science and engineering C*, v. 23, pp.551-560.
- PUIPPE, CL.J., 2003, "Surface treatments of titanium implants". *Europa cells and materials*, v. 5, suppl. 1, pp. 32-33.
- RATNER, BD, HOFFMAN, AS, SCHOEN, FJ, LEMONS, JE , 1996, "Biomaterials science: An introduction to materials in medicine". editors. San Diego, CA: Academic Press.
- ROSA, A.L., BELOTI, M.M., 2003, "Effect of cp Ti surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation". *Braz dent J*, v.14, pp. 16-21.
- RUPP, F. et al., 2004, "Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications". *Biomaterials*, v. 25, Issues 7-8, March-April, pp. 1429-1438.
- SANTOS Jr., E et al., 2007. *Materials Chemistry and Physics* 102, 92-97.
- SANTOS Jr, E., 2005, *Anodização de titânio comercialmente puro para aplicações biomédicas*. Tese de mestrado, UFRJ/RJ, Rio de Janeiro, Brasil.

- SANTIAGO, A. S., 2004. *Resposta de células osteoblasticas cultivadas sobre titânio com diferentes tratamentos de superfície*. Tese de mestrado, UFRJ/RJ, Rio de Janeiro, Brasil.
- SAZAKI, JM, BLEICHER, L., 2000, “Introdução a difração de raios-X em cristais”. Universidade Federal do Ceará, pp. 1-20.
- SCHWARZBAUER, J.E., SECHLER, J.L., 1999, “Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly”. *Curr Opin Cell Biol*, v.11, pp. 622-627.
- SENA, L.A., ROCHA, N.C.C., ANDRADE, M.C., SOARES, G.A., 2003, “Bioactivity assessment of titanium sheets electrochemically coated with thick oxide film”. *Surf. Coat. Tech.*, v. 166, pp. 254-258.
- SIEBERS, M.C. et al., 2004, “Integrin as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review”. *Biomaterials*.
- SILVA FILHO, F.C., MENEZES, G.C, 2004, “Osteoblasts attachment and adhesion: how bone cells fit fibronectin-coated surfaces”. *Mater. Sci. Eng. C*, v.24, pp. 637-641.
- SILVA, M.H.P., 1999, “Recobrimento de titânio com hidroxiapatita: desenvolvimento do processo de deposição eletrolítica e caracterização biológica in vitro”. Rio de Janeiro, Brasil.
- SUH, J.Y. et al., 2003, “Effect of hydrothermally treated anodic oxide films on osteoblast attachment and proliferation”. *Biomaterials*, v.24, pp. 347-335.
- SUL, Y.-T. et al., 2001, “The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes”. *Medical engineering & Physics*. v. 23, pp. 329-346.

- SUL, Y.-T., 2002, *On the bone tissue response to oxidized titanium implants. The role of microporous structure and chemical composition of the surface oxide in enhanced osseointegration*. Phd dissertation, Institute for surgical sciences. Göteborg University, Suécia.
- SUL, Y.-T. *et al.*, 2002a, “Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants”. *Biomaterials*, v. 23, pp. 1809-1817.
- SUL, Y.-T. *et al.*, 2002b, “Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides”. *Clin. Oral impl.*, v. 13, pp. 252-259.
- SUL, Y.T., JOHANSSON, C.B., KANG, Y. *et al.*, 2002c, “Bone reactions to oxidized titanium implants with electrochemical anion sulphuric acid and phosphoric acid incorporation”, *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v. 4, pp. 78-87.
- SUL, Y.-T., 2003, “The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant”. *Biomaterials*, v. 24, pp. 3893-3907.
- TENGVALL, P., LÜNDSTROM, I., 1992, “Physical chemical considerations of titanium as a biomaterial”. *Clinical materials*, v. 9, pp. 115-134.
- UWEB, 2006. <http://www.uweb.engr.washington.edu>. Último acesso janeiro.
- VAN OSS, C. J., 1994, “Interfacial Forces”. in *Aqueous Media*. Marcel Decker Inc., NewYork.
- VAN OSS, C.J., 1995a, “Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding”. *Molecular Immunology*. v. 32, n 3, pp. 199-211.
- VAN OSS, C.J., 1995b, “Hydrophobicity of biosurfaces- origin, quantitative determination and interaction energies”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, n.5, pp. 91-110.

- VELTEN, D.; BIEHL, V.; AUBERTIN, F.; VALESKE, B.; POSSART, W.; BREME, J., 2002, "Preparation of TiO<sub>2</sub> layers on cp-Ti and Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation and by sol-gel coating techniques and their characterization". *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 59, pp. 18-28.
- WANG *et al.*, 2001, "In vivo and in vitro investigation of titanium oxide layer coated on LTI-carbon by IBED". *J. Mater Sci*, n. 36, pp.2067-2072.
- WEI, M. *et al.*, 2002, "Apatite-forming ability of CaO-containing titanium". *Biomaterial*, v. 23, pp. 167-172.
- WEN *et al.*, 1998, "Preparation of bioactive microporous titanium surfaces by a new two-step chemical treatment". *Journal of materials science: Materials in medicine*, v. 91, pp.121-128.
- WENNERBERG, A., 1996, *On surface roughness and implant incorporation*. Phd dissertation, Institute for surgical sciences. Göteborg University, Suécia.
- WILLIAMS, D.F., 1976, "Corrosion of implant materials". *Ann. Rev. Mater. Sci.*, v. 6, pp. 237-265.
- XIALONG, Z.; KIM, K.H.; JEONG, Y., 2001, "Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial". *Biomaterials*, v. 22, pp. 2199-2206.
- XIONG, T.-Y. *et al.*, 2004, "Effect of surface morphology and crystal structure on bioactivity of titania films formed on titanium metal via anodic oxidation in sulfuric acid solution". *Key engineering materials*, v. 254-256, pp. 375-378.
- YAMADA, K.M., CRITCHLEY, D.R., FISHMAN,,P.H., MOSS,J., 1983, "Exogenous gangliosides enhance the interaction of fibronectin with ganglioside-deficient cells". *Exp Cell Res*, v. 143, pp. 295-302.
- YANG, B., UCHIDA, M., KIM, H.M. *et al.*, 2004, "Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment", *Biomaterials*, v. 25, pp. 1003-1010.

- YILDIRIM, I., 2001, *Surface free energy characterization of powders*. Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy in Mining and Minerals Engineering. Chapter 1. April.
- ZHU, X.; KIM, K.-H; JEONG, Y., 2001, “Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial”. *Biomaterials*, v. 22, n. 16, 15, August, pp. 2199-2206(8).
- ZHU, X.*et al.*, 2004, “Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses”. *Biomaterials*, v. 25, pp. 4087-4103.
- ZINGER,O *et al*, 2004, “Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography”. *Biomaterials*, v. 25, Issue 14, June, pp.2695-2711.
- ZINGER,O *et al.*, 2005, “Differential regulation of osteoblast by substrate microstructural features”. *Biomaterial*, v. 26, pp. 1837-1847.
- ZYGO; 2002. “MetroPro™ Surface Texture Parameters”, pp.1-10.