



JOSÉ SANDRO PEREIRA DA SILVA

**Estudo das características físico-químicas e biológicas pela
adesão de osteoblastos em superfícies de titânio
modificadas pela nitretação em plasma**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e
Traumatologia
Orientador: Prof. Dr. Alberto Tesconi Croci

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Jose Sandro Pereira da

Estudo das características físico-químicas e biológicas pela adesão de osteoblastos em superfícies de titânio modificadas pela nitretação em plasma / Jose Sandro Pereira da Silva. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Alberto Tesconi Croci.

Descritores: 1.Titânio 2.Osteoblastos 3.Aderência celular

4.Propriedades de superfície

USP/FM/SBD-362/08

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sebastião e Irene, que sempre me apoiaram com amor e dedicação, sem os quais não seria possível nenhuma realização.

À minha amada esposa Hallissa e nossa filha Júlia, pelo estímulo e compreensão nos momentos em que me ausentei do convívio familiar e às quais a minha dedicação jamais será suficiente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto Tesconi Croci, da Faculdade de Medicina da USP, por reservar parte de seu precioso tempo para me ensinar os princípios da metodologia científica elucidando minhas dúvidas durante todo o trabalho e, acima de tudo, ter me permitido liberdade em conduzir o experimento com instruções oportunas.

Ao Prof. Dr. Clodomiro Alves Junior, coordenador do Laboratório de Processamento a Plasma- LabPlasma/UFRN, pelas orientações valiosas, cessão de seu disputado laboratório e por estimular seus alunos no fascinante campo do estudo da ciência e engenharia de materiais.

À Profa. Dra. Marcia Martins Marques do departamento de dentística da FOU SP, pela introdução no fascinante campo dos estudos com cultura celular.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barbosa do departamento de Morfologia da UFRN, pela orientação e condução nos ensaios de cultura de células.

Ao Prof. Dr. Sandro Campos Amico da UFRGS pelo auxílio na caracterização das amostras, dispensando seu valioso tempo com orientações e sugestões relevantes ao trabalho.

À Profa. Dra. Helen Jamal Khoury, do IPEN- UFPE, pela colaboração na irradiação das amostras.

Aos Profs. Kênio Costa Lima e Ângelo Roncalli do departamento de Odontologia da UFRN pelas orientações na análise estatística dos resultados e por, principalmente, estimularem ao entendimento dos métodos de análise dos resultados do trabalho científico.

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas e símbolos	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 Interação do titânio com o meio biológico.....	7
2.2 Propriedades de superfície e caracterização.....	13
2.3 O processo de nitretação plasma	23
2.4 Nitretação do titânio.....	28
2.5 Resposta celular a superfícies de titânio modificadas.....	34
3. OBJETIVOS.....	51
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 Preparo das amostras.....	52
4.2 Protocolo de nitretação.....	52
4.3 Caracterização das amostras.....	55
4.3.1 Fases superficiais.....	55
4.3.2 Textura superficial.....	55
4.3.3 Rugosidade.....	56
4.3.4 Molhabilidade.....	57
4.4 Ensaio de adesão e proliferação celular.....	57
4.4.1 Curva de crescimento e viabilidade celular.....	59
4.5 Caracterização da morfologia celular por MEV.....	59
4.6 Análise estatística.....	60
5. RESULTADOS.....	61
5.1 Composição de camada.....	61
5.2 Textura superficial.....	62
5.3 Rugosidade.....	64
5.4 Molhabilidade	68
5.5 Adesão e proliferação celular.....	69
5.6 Curva de crescimento celular.....	72
5.7 Morfologia celular.....	72
6. DISCUSSÃO.....	74
7. CONCLUSÕES.....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático de uma amostra na nitretação em cátodo oco.....	27
Figura 2- Reator de plasma.....	54
Figura 3- Configuração de nitretação em gaiola catódica.....	54
Figura 4- Configuração de nitretação em modo planar.....	54
Figura 5- Desenho do experimento com cultura de células de acordo com os grupos.....	58
Figura 6- Difratoograma por rX das amostras em diferentes condições de tratamento 2θ	61
Figura 7- Textura de superfície das diferentes condições de tratamento por microscopia eletrônica de varredura.....	62
Figura 8- Topografia tridimensional dos diferentes tipos de tratamento por microscopia de força atômica (MFA).....	64
Figura 9- Valores de rugosidade media (R_a) obtidos por microscopia de força atômica.....	67
Figura 10- Valores de rugosidade media (R_a) obtidos por profilômetro mecânico.....	67
Figura 11- Ângulo de contato nas diferentes superfícies do titânio.....	68
Figura 12- Ângulo de contato nas diferentes superfícies de titânio.....	69
Figura 13- Adesão de osteoblastos MC3T3 em 24 horas nos diferentes grupos.....	71
Figura 14- Proliferação de osteoblastos MC3T3 em 72 horas nos diferentes grupos.....	71
Figura 15- Adesão e proliferação de osteoblastos MC3T3 nas diferentes superfícies de titânio em 24,48 e 72 horas (a,b e c respectivamente) visualizadas por MEV.....	71
Figura 16- Proliferação celular nos diferentes grupos identificados por MEV.....	72
Figura 17- Morfologia dos osteoblastos em 24h nas diferentes superfícies.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Graus de pureza do titânio.....	2
Tabela 2- Parâmetros de tratamento com plasma de nitrogênio.....	55
Tabela 3- Valores de rugosidade obtidos por microscopia de força atômica (MFA).....	65
Tabela 4- Valores de rugosidade obtidos por profilômetro mecânico.....	65
Tabela 5- Número de amostras, medianas, quartil 25, média dos postos e significância estatística para valores de rugosidade (R_a) referentes aos diferentes tratamentos do titânio obtidos por microscopia de força atômica.....	66
Tabela 6- Número de amostras, medianas, quartil 25 e 75, média dos postos e significância estatística para valores de rugosidade (R_a) referentes aos diferentes tratamentos do titânio obtidos por profilômetro mecânico.....	67
Tabela 7- Número de amostras, medianas, quartil 25, média dos postos e significância estatística para os valores dos ângulos de contato referentes aos diferentes tratamentos do titânio.....	69
Tabela 8- Número de amostras, medianas, quartil 25 e 75, média dos postos e significância estatística para valores de adesão celular em 24 horas referentes aos diferentes tratamentos do titânio.....	70
Tabela 9- Número de amostras, medianas, quartil 25 e 75, média dos postos e significância estatística para valores de proliferação celular em 72 horas referentes aos diferentes tratamentos do titânio.....	70

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
A	ampère
bar	unidade de pressão em dinas/cm ² (1mbar=10 ³ barias= 100Pa)
DC	Corrente contínua
EDX	Energia dispersiva de Rx
H ₂	Hidrogênio
K	Constante dielétrica
Kgf/mm	Kilograma força por milímetro
MFA	Microscopia de força atômica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mm ²	milímetro quadrado
N ₂	Nitrogênio
Pa	pascal
SLA	Jato de areia com granulação grande + ácido (HCl/H ₂ SO ₄)
Ticp	Titânio comercialmente puro
TiN	Nitreto de titânio
Torr	unidade de pressão em mmHg
V	volt
W/cm ²	Watts por centímetro quadrado.
Θ	Ângulo de contato
γ _L	Tensão superficial líquido/ar
γ _S	Tensão superficial sólido/ar
γ _{LV}	Tensão superficial líquido/vapor
γ _{SL}	Tensão superficial sólido/líquido
CVD	Deposição química por plasma
PVD	Deposição física por plasma
XDR	Difratometria de Rx
PIRAC	Powder immersion reaction assisted coating
Ra	Desvio médio aritmético da rugosidade

RESUMO

SILVA, J. S. P. Estudo das características físico-químicas e biológicas pela adesão de osteoblastos em superfícies de titânio modificadas pela nitretação em plasma [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

INTRODUÇÃO: Superfícies de titânio modificadas por diferentes métodos foram estudadas com base nos parâmetros físicos e químicos de caracterização superficial e sua influência no comportamento de células pré-osteoblásticas (MC3T3) *in vitro*. **MÉTODOS:** Discos de titânio comercialmente puro grau II foram submetidos a três métodos de modificação de superfície (polimento, nitretados em plasma em configuração planar e gaiola catódica). As diferentes superfícies foram caracterizadas para observar o efeito do processamento na estrutura da camada superficial, na rugosidade e molhabilidade. Ensaios de adesão e proliferação celular usando linhagens de células pré-osteoblásticas MC3T3 foram realizados para avaliar o efeito das novas superfícies no comportamento celular *in vitro*. **RESULTADOS:** Os resultados demonstraram que a nitretação em plasma na configuração de gaiola catódica produz superfícies mais rugosas ($p < 0,02$) e com menores ângulos de contato com a água. **CONCLUSÕES:** A adesão celular é maior nas superfícies mais rugosas do que nas superfícies polidas ($p < 0,05$) e reagem de modo diferente a composição química do substrato e à topografia da superfície.

Descritores: 1.Titânio 2.Osteoblastos 3.Aderência celular 4.Propriedades de superfície

SUMMARY

SILVA, J. S. P. Study of physical-chemical and osteoblast adhesion characteristics of titanium surfaces modified by plasma nitriding [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008.

PURPOSE: The aim of this study was to evaluate the physico-chemical properties of different titanium surfaces modified by means of low temperature plasma nitriding on rat osteoblast cell adhesion and proliferation. **METHODS:** Pure Titanium discs grade II was submitted to three different surface preparations (polishing, glow discharge plasma nitriding in planar and cathodic cage configurations). Surface parameters as roughness, wettability and chemical composition was determined to compare influence of gas mixture on the modified surface material properties. Cellular morphology was observed by scanning electron microscopy. To evaluate the effect of the surface on cellular response, osteoblast cells (MC3T3) adhesion and proliferation was quantified and data analysed by Kruskal-Wallis and Friedman statistical tests. **RESULTS:** plasma nitriding discs shows rougher surfaces ($p < 0,02$) in cathodic cage configuration and lower contact angle values. MC3T3 cells attached on rough surfaces produced by cathodic cage configuration was statistically significant $p < 0,05$ compared to polished discs. **CONCLUSIONS:** Glow discharge plasma nitriding improve titanium surface roughness and wettability. MC3T3 cell adhesion behavior is related to substrate chemical composition and topography.

Descriptors: 1.Titanium 2.Osteoblasts 3.Cellular adhesion 4.Surface Characterization

1 INTRODUÇÃO

O estudo de materiais com aplicação biomédica tem se tornado um ramo abrangente do conhecimento científico, muito provavelmente porque existem problemas clínicos que necessitam de implantes para sua solução.

Branemark et al. (1969) observaram em seu estudo clássico sobre revascularização do tecido ósseo em áreas de fratura que o titânio apresentava alta resistência à remoção em condições experimentais e lançaram as bases científicas do que atualmente é conhecido como osseointegração. O desenvolvimento dessas pesquisas resultou na criação de dispositivos metálicos para utilização em pacientes desdentados totais com a finalidade de substituição de elementos dentários perdidos e da reabilitação com prótese implanto-suportada (Branemark et al., 1985)

Estima-se que grande quantidade de dispositivos médicos com aplicação clínica seja utilizada anualmente em todo o mundo em áreas como ortopedia e odontologia, tais como próteses metálicas para reconstrução articular e implantes dentários fabricados em titânio.

Os sistemas de implantes odontológicos fabricados atualmente são confeccionados em titânio comercialmente puro (Ti_{cp}) ou uma de suas ligas de interesse da odontologia (como Ti-Al e Ti-V). Dessas ligas, a mais comum contém 6% de alumínio e 4% de vanádio e é conhecida como Ti₆Al₄V. Elas são leves, fortes e altamente resistentes à fadiga e corrosão, embora sejam mais duras que o osso. Seu módulo de elasticidade é 114×10^3 MPa e é mais

próximo do módulo de elasticidade do osso de 16.5×10^3 MPa que qualquer outro material utilizado na fabricação de implantes endósseos, com exceção do Ti6Al4V cujo módulo de elasticidade é de 103.4×10^3 Mpa. Esta propriedade permite uma maior distribuição das forças na interface osso-implante (Parr, 1985).

A produção comercial do titânio é rigidamente controlada pela sociedade americana para análise e padronização de materiais (ASTM), que estabelece normas específicas para os graus de contaminação do titânio e para suas ligas de Ti6Al4V, utilizadas na fabricação de implante de uso cirúrgico (ASTM, 1976). As diferentes concentrações dos elementos nitrogênio, carbono, hidrogênio, ferro, oxigênio e titânio, assim como suas propriedades mecânicas, distinguem os diferentes graus de pureza do titânio (tabela 1).

Tabela 1 – Graus de pureza do titânio

Liga	Elemento (% de impureza)							Ti
	N	C	H	Fe	O	Al	V	
Ti grau I	0,03	0,10	0,015	0,02	0,18			restante
Ti grau II	0,03	0,10	0,015	0,03	0,25			restante
Ti grau III	0,05	0,10	0,015	0,03	0,35			restante
Ti grau IV	0,05	0,10	0,015	0,05	0,40			restante
Ti Al₆V₄	0,05	0,08	0,012	0,25	0,13	5,5-6,5	3,5-4,5	restante

Um dos problemas mais freqüentes é a interação de material metálico com tecidos orgânicos, traduzida pela sua biocompatibilidade que envolve aspectos físicos, químicos, biológicos, metalúrgicos e cirúrgicos. Em relação às próteses metálicas, um problema clínico importante refere-se à integração desses materiais com o tecido ósseo. Fatores como estabilidade primária,

velocidade de osseointegração, resistência mecânica e biocompatibilidade são requisitos fundamentais desses biomateriais.

Biocompatibilidade é definida como “uma coleção de fenômenos associados às interações entre os biomateriais e o ambiente fisiológico que permita a coexistência de ambos”. Esse fenômeno é observado na interface entre o material e o sistema biológico onde está sendo implantado, pelo comportamento dos constituintes moleculares do meio e sua interação com os componentes moleculares da superfície. De tal modo, as propriedades de superfície, química e física, são determinantes da biocompatibilidade de um material (Ratner, 1990). Essas propriedades, em geral, governam a resposta biológica a um material implantado em tecidos vivos. A forma, textura de superfície e composição química da camada superficial interferem no desempenho do implante (McMillan et al., 2000).

Nesse aspecto, o desenvolvimento de superfícies é um ponto crítico para o biomaterial, de modo que a natureza da superfície de um implante influencia sua interação com os fluidos do corpo e em particular com as proteínas, desencadeando uma cascata de reações que culmina com o estabelecimento de uma interface implante/tecido (Brunette, 1988). O entendimento das características das superfícies dos materiais é particularmente importante para compreensão de sua biocompatibilidade, principalmente quando se pretende desenvolver um implante para uso clínico uma vez que as diferentes propriedades de superfície desempenham um papel importante na reação do corpo humano ao material artificial.

Dos materiais metálicos que apresentam aplicação clínica em seres humanos, o titânio é provavelmente o mais utilizado por apresentar excelente biocompatibilidade, atribuída à formação de um filme de óxido quimicamente estável (TiO_2) formado na sua superfície em contato com o ar, que previne a corrosão do metal, além de interagir eletricamente com moléculas de proteínas dos tecidos biológicos através de sua camada externa hidrofílica. Na superfície do titânio formam-se filmes finos de óxidos estáveis, tais como: TiO_2 , TiO , Ti_2O_3 , sendo que o mais comum é o TiO_2 . Todos eles apresentam constantes dielétricas (K) altas (50 a 120), propriedade essa que pode retardar o movimento celular sobre superfícies desde um meio aquoso e causar menor desnaturação das proteínas, que estaria relacionada com a íntima relação observada entre titânio e tecido ósseo (Branemark et al., 1985).

No TiCp existem vários óxidos, sendo que mais próximo do metal verifica-se uma predominância de TiO e adjacente ao tecido o TiO_2 . A camada de TiO_2 , formada espontaneamente durante o processo de torneamento dos implantes, é semicondutora ou não condutora e previne a troca de elétrons e qualquer reação redox na superfície. Dessa forma, os produtos de corrosão nos tecidos não estão em forma de íon, mas como óxidos estáveis. Em meios fisiológicos a camada de óxido é altamente protetora prevenindo o contato entre o meio e o metal base, o que significa que não existe o contato direto entre o metal e seus tecidos hospedeiros, mas certamente entre o tecido e a superfície do óxido formado (Kasemo, 1998). Essas características tornam vantajosa a aplicação do titânio como

material para a confecção de implantes metálicos em medicina e odontologia.

A literatura especializada relata um grande crescimento de técnicas de tratamento de superfícies que são ambientalmente limpas. Dentre elas está a nitretação iônica, que consiste na deposição de nitretos em superfícies metálicas quando inseridas em plasma de nitrogênio. Além do fator ambiental, várias são as vantagens desta técnica sobre as convencionais, tais como baixa temperatura de tratamento, melhor controle da espessura da camada, tempo de tratamento inferior, uniformidade na espessura da camada, nitretação de partes da peça, maior economia (Alves Jr, 1995).

As alterações superficiais causadas pela formação de nitretos de titânio, através do uso de técnicas como nitretação em plasma têm levado ao desenvolvimento recente e progressivo de pesquisas que investigam suas propriedades biológicas. O nitreto de titânio é considerado pela Food and Drugs Administration como um material biologicamente inerte e adequado ao uso em implantes de titânio e suas ligas (Sovak, 2000).

A nitretação de implantes de titânio cilíndricos com o mesmo padrão de modelagem de uso corrente no mercado pode gerar superfícies com a formação de nitretos de titânio de topografia homogênea e com alta molhabilidade em condições experimentais bem controladas, sugerindo um potencial favorável para aplicação em ambientes biológicos (Guerra-Neto, 2006).

Vários métodos de tratamento de superfície têm sido aplicados ao

titânio, particularmente com a finalidade de alteração topográfica, todos com o objetivo primordial de fazer com que essas alterações estruturais possam exercer algum grau de controle no modo como o corpo interage com a superfície do biomaterial, como por exemplo, melhorando a integração de uma prótese de quadril ou de um implante dentário com o tecido ósseo.

Tratamentos de superfície, como o jateamento com plasma de titânio, jateamento com partículas de sílica, subtração por ataque ácido, implantação iônica e revestimento com fosfato de cálcio estão disponíveis comercialmente com eficácia clínica comprovada (>95% acima de cinco anos). O papel preciso da composição química da superfície e da topografia nos eventos iniciais da osseointegração em implantes dentais ainda não estão claramente compreendidos (Le Guéhennec et al., 2007).

Baseado nessas considerações iniciais, o objetivo deste estudo é avaliar as características físico-químicas e biológicas pela adesão de osteoblastos em superfícies de titânio modificadas pela nitretação em plasma.

As normas de apresentação das citações bibliográficas e estrutura geral deste trabalho obedecem aos padrões descritos por Cunha (1991) publicado pelo Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguiram as normas vigentes no “List of Journals Indexed in the Index Medicus”, publicado pela National Library of Medicine.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INTERAÇÃO DO TITÂNIO COM MEIO BIOLÓGICO

A interação do titânio com o meio biológico ocorre na interface do material por meio de ligações químicas com os fluidos teciduais que desencadeiam a seqüência de eventos moleculares e celulares que podem resultar no processo de osseointegração. Biomoléculas podem unir-se à superfície do titânio num meio biológico por forças Van der Waals, ligações covalentes, iônicas e ligações de hidrogênio. Para as ligações do tipo Forças de Van der Waals, a constante dielétrica do óxido da superfície e a polaridade das moléculas ou grupo de radicais que se unem às superfícies são importantes parâmetros físicos que determinam a força da união. A alta constante dielétrica dos óxidos de titânio pode ser um fator crucial que distingue o titânio de outros metais para implantes (Parsegian, 1983).

O segundo tipo de ligação deve-se às camadas carregadas da superfície e à superposição de moléculas adsorvidas. Esse tipo de união se estabelece através de fortes ligações covalentes e iônicas, ou seja, entre dipolos elétricos permanentes, freqüentes tanto em biomoléculas como em superfícies de óxido polar, e se caracteriza por sua curta extensão e suas dimensões atômicas freqüentemente com um alto grau de direcionalidade. Particularmente, ligações fortes podem se estabelecer em locais de defeitos

específicos das superfícies, tais como vazios ou espaços aniônicos ou catiônicos, átomos com impurezas e nas áreas de união entre os grãos (Jansen, 1991).

Um terceiro tipo de ligação importante na interação biomolecular está representado pelas ligações de hidrogênio. O ambiente biológico é aquoso, e pode participar das ligações de hidrogênio além de modificar, em alguns momentos, as ligações iônicas de forma que os íons serão hidratados, isto é, rodeados de uma camada de água (Kasemo, Lausmaa, 1988). Deste modo, a superfície de óxido de titânio oferece uma grande extensão para os diferentes tipos de uniões, quais sejam as forças de união e as uniões de tipo químico. Considerando o largo espectro de biomoléculas expostas à superfície, é provável que algumas dessas ligações sejam estabelecidas: algumas representando uniões irreversíveis e outras caracterizadas por um contínuo intercâmbio de moléculas num equilíbrio dinâmico (Kasemo, Lausmaa, 1988).

Embora a camada de óxido seja, termodinamicamente, muito estável, reações com o fluido ou meio biológico podem ocorrer. Espécies contendo titânio são liberadas nos tecidos adjacentes e, ao mesmo tempo, espécies contendo oxigênio nos fluidos biológicos são adsorvidas, levando ao aumento na espessura da camada de óxido. Existe a possibilidade de dissolução da camada protetora de óxido, o processo químico, denominado corrosão, que representa um problema sério para alguns materiais de implante, parece ser um processo muito lento com o titânio, provavelmente devido à alta estabilidade de seus óxidos.

Outros processos químicos ocorrem na superfície do óxido como a adsorção e a dessorção de moléculas. A força da ligação entre a biomolécula e a superfície determina se haverá ou não dessorção ou substituição das biomoléculas. A hidratação do óxido é outro processo que provavelmente ocorre e que pode ser muito importante para o estabelecimento de um ambiente químico apropriado para as biomoléculas (Parsegian, 1983).

A superfície do implante parece exercer influência no ambiente biológico e nos processos biológicos na interface que determinarão o sucesso ou falha da implantação. É importante que o implante não tenha um efeito de desnaturação das proteínas na superfície. Se a desnaturação ocorrer, dependerá do tipo e resistência da união entre a proteína em questão e a superfície. Se as uniões internas que determinam a conformação da proteína são influenciadas de forma muito forte, ocorrerá a desnaturação. Se, pelo contrário, forem levemente afetadas, as proteínas permanecerão na sua conformação original. Uma forma de prevenir a desnaturação das proteínas é através de uma adsorção seletiva de biomoléculas pelas superfícies que formam uma camada de separação entre as superfícies do implante e as proteínas (Kasemo, Lausmaa, 1988).

A superfície hidratada se desenvolve nas primeiras frações de segundo após o contato e é composta por várias macromoléculas adsorvíveis bem como células potencialmente adesivas. Algumas dessas biomoléculas se unirão através das ligações descritas acima, e muitas outras eventualmente serão substituídas por moléculas mais eficientes. A superfície

do material é transformada, imediatamente, pela adsorção instantânea de filmes predominantemente protéicos. Esses filmes condicionadores deverão formar-se em uma espessura em torno de $1\mu\text{m}$, antes de uma colonização bem sucedida de células de qualquer tipo (Kasemo, Lausmaa, 1988).

Existem diferentes escalas nos eventos que ocorrem na interface implante-tecido. O nível macroscópico visível a olho nu e o nível molecular onde o implante de titânio é coberto por uma superfície de óxido de aproximadamente 2 a 5nm de espessura (Kasemo, 1998). Moléculas protéicas unem-se à superfície de óxido e a natureza da interação entre a superfície mais externa de átomos do implante e as proteínas (e/ou outras biomoléculas) é crucial para a resposta do sistema biológico ao implante. Ambas, a microarquitetura (microgeometria, rugosidade) da superfície e sua composição química são importantes no estabelecimento dessa interação pelos seguintes aspectos:

1- Uma superfície lisa e uma superfície curva ou rugosa respectivamente causam diferentes áreas de contato com biomoléculas e células. As diferentes áreas de contato produzem diferentes tipos de uniões de unidades biológicas que podem influenciar sua conformação e função.

2- Variações na composição química das superfícies produzem diferentes tipos de união às biomoléculas as quais podem, então, afetar suas propriedades. A composição da superfície química determina amplamente a estabilidade química e reatividade do material do implante.

Um fator essencial, nesse contexto, é como a superfície do material interage com a água. Se a superfície se ligar fortemente com a água, ou

seja, se for uma superfície hidrofílica, a proteína com sua cápsula de água considerará a superfície como similar à água. Essa proteína interagirá com o material indiretamente, através da intermediação de uma camada de água, e permanecerá em seu estado conformacional normal. Se, ao contrário, a superfície repelir ou tiver uma ligação frágil com a água, ou seja, se a superfície for hidrofóbica, a proteína estará mais próxima a formar ligações diretamente com os átomos da superfície, os quais poderão causar então mudanças na forma ou sua desnaturação. Essa é mais uma combinação da micro-arquitetura e de composição química da superfície que, espera-se, determine completamente a interação mútua entre o implante e o sistema biológico. Outros fatores são também importantes, como posicionamento do implante, procedimento cirúrgico, condições cicatriciais (Kasemo, 1988).

A interação molecular entre a superfície do implante e o tecido é de suma importância. As células interagem com a camada de biomoléculas e água que estão ligadas à superfície, e a natureza e propriedades das biomoléculas estão determinadas primariamente pela superfície. A natureza da camada de biomoléculas na superfície determinará como as células respondem a ela. Conseqüentemente, há uma interação célula/superfície mediada pela intervenção das camadas de biomoléculas mais água (Kasemo, 1998).

No período inicial após a implantação haverá essencialmente água, íons dissolvidos e biomoléculas livres na região mais próxima da superfície. A composição do biolíquido mudará continuamente, conforme o processo inflamatório de cicatrização progrida, o que provavelmente causa mudanças

na composição da camada de biomoléculas adsorvidas na superfície do implante durante os primeiros minutos e posteriormente ao longo dos dias que sucedem a implantação. As células, ao se aproximarem da superfície e, dependendo da natureza das camadas adsorvidas, respondem de forma específica, podendo ainda modificá-la. Com o tempo, os tipos de células mais próximas às superfícies e suas atividades poderão mudar, dependendo do tipo de interação inicial, assim o resultado final poderá ser a formação de uma cápsula fibrosa ou a osseointegração (Kasemo, 1998). As propriedades iniciais da superfície do implante determinam, de forma decisiva, a natureza e as propriedades da camada de água e biomoléculas que eventualmente são adsorvidas nela, o que influenciará o comportamento das células, quando alcançarem a superfície.

Os eventos cicatriciais que ocorrem na interface entre tecido ósseo e implante seguem certa seqüência de eventos importantes (Cooper, 2000). No início, o corte do tecido ósseo é preenchido por sangue que se organiza em coágulo. Para que esse coágulo ocorra adequadamente são importantes os aspectos de energia superficial na distribuição do sangue na superfície do metal, e formação de óxido, pela influência que esta camada externa pode exercer na conformação destas estruturas. A micro-rugosidade tem o papel de conduzir a migração de células sobre a superfície do material biocompatível. Segundo o processo de cicatrização, o coágulo sanguíneo é transformado pelas células fagocitárias, como os leucócitos polimorfonucleares, células linfóides e macrófagos. A atividade fagocitária atinge o nível máximo durante o tempo entre o primeiro e o terceiro dia após

a cirurgia. Durante este período ocorre a formação do pré-calo, contendo fibroblastos, tecidos fibrosos e fagócitos. O pré-calo se transforma em tecido conjuntivo denso, e células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos e fibroblastos. O tecido conjuntivo é chamado de calo, incluindo osteoblastos que aparecem na superfície do implante. Fibras osteogênicas, formadas por osteoblastos, têm potencial de calcificação. O tecido conjuntivo denso forma então um calo fibrocartilaginoso, que ocorre normalmente entre o implante e o osso. O osso neoformado penetra e a nova matriz óssea é chamada de calo ósseo. O novo osso amadurece, aumentando em densidade e dureza. Nessa fase, a prótese pode ser apoiada nos implantes e, sob estímulo, ocorre a remodelação óssea. O osso haversiano calcifica, tornando-se denso e homogêneo. Os esforços oclusais estimulam o osso circundante a se remodelar, e os implantes osseointegrados podem resistir às funções mastigatórias (Cooper, 2000).

2.2 PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE E CARACTERIZAÇÃO

As propriedades de superfície do titânio que afetam a resposta celular têm sido descritas em termos de composição química, energia de superfície, molhabilidade e topografia superficial. Essas propriedades dependem do elemento químico e suas ligações, do tipo do material e ainda são afetadas

pelo tipo de processamento ao qual o material é submetido (Kipaldi, Lemons, 1994).

Define-se superfície como a interrupção do arranjo atômico cristalográfico ordenado que pode existir em diferentes estruturas. Esta interrupção ocasiona uma alteração no comportamento eletrônico do conjunto atômico do material, modificando as propriedades físico-químicas no local (Kipaldi, Lemons, 1994).

O processo original de fabricação de implantes de titânio para implantação nos maxilares produz a superfície usinada com valores de rugosidade (Ra) entre 0,5 e 1,0 μ m. Tem sido utilizado com sucesso no decorrer das últimas décadas, embora estudos tenham demonstrado que a modificação da topografia tende a aumentar a área de contato osso-implante e a resistência da união na interface (Wennerberg, 1999).

Superfícies com valores de rugosidade média (Ra) $\leq 1\mu$ m são consideradas lisas e aquelas acima de 1 μ m, rugosas. O modo como a superfície é produzida pode gerar topografias orientadas ou aleatórias. Por exemplo, em superfícies usinadas em tornos mecânicos, a direção e o fio da ferramenta de corte originam sulcos periódicos de orientação paralela. Esta característica da topografia parece ter a capacidade de influenciar a orientação e a locomoção de tipos específicos de células e de diretamente afetar a forma e função celular (Sykaras, 2000). Entretanto, a rugosidade média não é o único parâmetro de avaliação da rugosidade de uma superfície.

Molhabilidade é a medida do ângulo de contato crítico formado pelo espalhamento de uma gota de líquido em uma superfície. Este dado pode ser expresso em tensão superficial crítica (dinas/cm^2). O material com tensão superficial crítica de 20 a 30 dinas/cm^2 exibe mínima adesividade biológica. A textura superficial em um implante tem o potencial de selecionar certas populações celulares e alterar suas funções, por exemplo, fibroblastos se acumulam em superfícies lisas, enquanto os macrófagos preferem superfície rugosa, comportamento denominado de rugofilia. Desta forma, seria esperado que células preferissem aderir umas às outras ou à matriz extracelular do que à superfície de um material com baixa energia superficial (material com pobre adesividade), assim, essa situação resultaria em formação de cápsula fibrosa (Brunette, 1999).

A topografia superficial pode afetar a orientação e a locomoção de células epiteliais e fibroblastos. Um efeito do substrato mais estudado no comportamento celular é o direcionamento de contato, que se refere à tendência das células serem guiadas em sua direção de locomoção pela forma do substrato. Este modelo é baseado no modo de locomoção celular controlado pela contração de feixes de microfilamentos inseridos no contato focal (Kasemo, 1998)

A adesão é definida como a força que faz com que duas ou mais substâncias se unam quando colocadas em íntimo contato. Quando moléculas de substâncias diferentes se mantêm juntas, estas forças são chamadas de “adesivas”; quando essas moléculas são de uma mesma substância, as forças se denominam de “coesivas”. Para a adesão se

completar, deverá ocorrer uma molhabilidade inicial que, em biomateriais, usualmente é associada com a molhabilidade de uma superfície sólida por um líquido apropriado (Kasemo, 2000).

A tensão superficial não só garante o molhamento da camada de líquido sobre o substrato como também assegura a adesão dessa camada e sua durabilidade. Muitos estudos têm sido feitos sobre a relação das forças de adesão e tensão superficial, uma vez que a adesão é governada por diferentes mecanismos, e, em diferentes casos, não se pode fazer afirmações definitivas. De qualquer modo, a força de adesão depende da tensão superficial de ambos os componentes e, conseqüentemente, da tensão interfacial. A força de adesão é aumentada ao máximo quando a tensão superficial dos dois componentes tem magnitudes similares, o que parece dever-se à redução da tensão interfacial (Kasemo, 2000).

Considerando o papel preponderante que as características de novas superfícies de biomateriais têm no reparo do tecido, estas são descritas em três categorias: textura (ou rugosidade), carga (ou potencial elétrico) e química, normalmente descritas em valores de energia de superfície como por exemplo: tensão superficial. Para cada novo método de modificação de superfícies metálicas com finalidade biomédica, deve-se proceder aos estudos que descrevam as alterações em termos de parâmetros objetivos (Kasemo, 2000).

Os métodos de análise da topografia de materiais metálicos modificados, notadamente o titânio, consistem em transcrever a informação da oscilação do perfil da superfície em valores médios que podem ser

interpretados em função do objeto de estudo. Existem três grandes grupos de instrumentos que fornecem informações quantitativa e qualitativa para avaliação topográfica da superfície e estão divididos em profilômetros de contato mecânico, óptico e microscópios de sondagem por varredura (Wennerberg, Albrektsson, 2000).

Os profilômetros ou rugosímetros mecânicos são os dispositivos de mensuração mais utilizados e são compostos por uma agulha de diamante apoiada num cantiléver que varre a superfície da amostra na direção horizontal. A oscilação do cantiléver registra no eixo vertical o perfil da superfície em modo digital ou analógico originando gráficos para análise. A característica da agulha de diamante acaba por influenciar a medida dependendo do raio (2 a 10 μm) e do ângulo da ponta (60° a 90°).

Na pesquisa com implantes de titânio, os rugosímetros de contato são utilizados para avaliar implantes cilíndricos e amostras planas e também para medir a rugosidade de implantes ortopédicos removidos do leito cirúrgico. O desenho do implante pode determinar que tipo de instrumento é o mais adequado e onde a medida pode ser feita. Discos e cilindros são bem avaliados por rugosímetros de contato, enquanto apenas algumas partes de implantes na forma de parafusos pode ser avaliadas por este método (Wennerberg, Albrektsson, 2000).

Os instrumentos ópticos são interessantes pelo fato de não danificar a superfície de materiais moles e vulneráveis, além de ser um método mais rápido e de fornecer melhor resolução do que os rugosímetros de contato mecânico. Dentre as possibilidades destacam-se a microscopia de varredura

confocal a Laser (MCL) e a microscopia de força atômica (MFA). A microscopia de força atômica utiliza uma ponta de dimensões que varia de 6 a 60 nanômetros(nm) a pressão e velocidades constantes. Tem como limitação a área de mensuração reduzida no sentido vertical máximo de 6 μm , que pode ser muito pequeno para determinadas superfícies de implantes (Vanzillotta et al., 2004)

Além do equipamento, os parâmetros de avaliação da superfície devem ser considerados, como a calibração do aparelho e as características de superfície, definidas como forma, ondulação e rugosidade. Naturalmente, a rugosidade é o parâmetro filtrado dos erros de forma e ondulação. Esse filtro é estabelecido pelo equipamento por meio do *cut-off* que é o espaçamento da extensão da medida total da superfície. Geralmente estabelece-se um *cut-off* de 2,5 vezes o espaçamento de pico a pico e um quinto da extensão total da medida.

Em uma revisão sobre os efeitos da topografia da superfície, a diferença que mais chama atenção entre implantes dentais comercialmente disponíveis é a topografia superficial. Macroscopicamente, há implantes em forma de parafuso, cilíndricos, cônicos e lâminas. Microscopicamente alguns implantes têm superfície lisa, enquanto outras são usinadas, texturizadas ou porosas. Uma razão para estas diferentes propriedades superficiais, por exemplo, a porção que atravessa o epitélio gengival é freqüentemente lisa na tentativa de produzir um colar epitelial que resista a invasão bacteriana, enquanto que o corpo do implante deve ser poroso para promover

crescimento de tecido ósseo e, então, produzir estabilização (Sykaras et al., 2000)

Uma grandeza importante na avaliação da molhabilidade entre duas superfícies é o ângulo de contato. Ele é definido como o ângulo formado entre a superfície sólida e a tangente à superfície do líquido no ponto de contato dos dois. O ângulo de contato pode variar de 0 a 180 graus. A condição de equilíbrio de energia interfacial na área de contato pode-se expressar em termos de energia interfacial da interface sólido/líquido (γ_{sl}), interface líquido/vapor (γ_{lv}), interface sólido/vapor (γ_{sv}) e o ângulo de contato (θ), pela equação de Young:

$$\gamma_{sl} = \gamma_{lv} + \gamma_{sv} \cos \theta \quad (1)$$

onde pode-se considerar o γ como a energia superficial ou tensão superficial que é referida em dyna/cm, erg/cm² ou N/m e termodinamicamente representa a energia necessária criada numa unidade de área na interface ou superfície onde não existia previamente (Ratner, 1990).

Os três tipos de molhabilidade podem ser interpretados agora, de acordo com os seguintes valores do ângulo de contato:

Não-molhabilidade: $\theta > 90^\circ$;

Molhabilidade: $\theta < 90^\circ$;

Como visto, o valor de $\theta = 90^\circ$ é então o limite entre a situação de molhabilidade e não-molhabilidade.

Desde que a molhabilidade seja dependente da superfície do material, todos os procedimentos que possam alterar apreciavelmente o caráter do

substrato afetarão, de forma significativa, as características de molhabilidade desse substrato (Baier, 1986).

Os métodos para determinação dos ângulos de contato são usados de forma rotineira na caracterização de biomateriais para descrever a molhabilidade ou calcular/estimar a energia superficial. É de interesse experimental no estudo do ângulo de contato incluir contaminação e a apropriada escolha de solventes. Os líquidos utilizados comumente são orgânicos e particularmente água para biomateriais, e o ângulo de contato pode ser medido com a superfície sólida exposta tanto a líquido ou a vapor (Ratner, 1990).

A possibilidade de que a energia superficial de um sólido γ possa influenciar ou controlar as interações de proteínas e células com o material tem exercido grande influência na ciência dos biomateriais. A caracterização da energia de superfícies de implantes de titânio demonstra os efeitos do tratamento da superfície, tamanho dos grânulos e a rugosidade na tensão superficial e molhabilidade do titânio puro. O plasma de descarga luminescente por radiofrequência confere uma superfície com alta tensão superficial quando comparado a amostras esterilizadas por calor, enquanto amostras não submetidas a tratamento tem os menores valores de tensão. A tensão em superfícies com grânulos de 23 μ m não difere daquelas com granulações da ordem de 70 μ m. Já a rugosidade interfere diretamente nos ângulos de contato do líquido com a superfície. Todas as amostras avaliadas estão dentro de uma faixa de 30 a 50 dinas/cm, sugerindo que os

biomateriais metálicos a base de titânio são favoráveis à osseointegração mesmo sem receber qualquer tipo de tratamento (Kilpadi e Lemons, 1994).

A molhabilidade também é influenciada pela energia de superfície do material, sendo definida como a energia na superfície de um sólido, a qual é maior do que a energia no centro do material. Os átomos da camada externa não estão ligados uns aos outros com a mesma energia, ao contrário daqueles nas camadas mais internas. Essa diferença se dá em razão de as ligações estarem insaturadas na superfície gerando energia livre. O ângulo de contato é característico da tensão superficial do líquido e da energia de superfície do sólido ao qual está em contato (Kilpadi e Lemons, 1994).

O tipo de tratamento dado a superfície do material pode afetar a molhabilidade de modo positivo ou negativo. Placas de titânio puro e liga de $Ti_6 Al_4 V$ submetidas a diferentes tipos de alteração superficial foram avaliadas quanto a molhabilidade da superfície através da técnica da gota séssil com água destilada e glicerol. O objetivo do estudo foi observar se o tipo de tratamento afeta a molhabilidade. Ligas de titânio revestidas com hidroxiapatita obtiveram o menor ângulo de contato(θ) entre os diversos tipos de superfície (Mekayarajjanannoth, Winkler, 1999).

Uma importante contribuição ao entendimento da molhabilidade superficial foi apresentado por Lim et al. (2001). Foram avaliados três tipos de materiais usados para a produção de implantes dentais – TiCp grau II, liga $Ti_6 Al_4 V$ e TiNi - polidas com lixas de carvão de silício e submetidas a treze processos de modificação superficial, incluindo métodos clássicos utilizados

em escala industrial e inovações experimentais. Além disso quatro meios distintos foram escolhidos para a medição do ângulo de contato – água destilada, NaCl a 1%, suspensão de neutrófilo e suspensão contendo osteoblastos MG63. Duas placas de cada material foram expostas a três gotas de cada meio e avaliadas por dois observadores independentes, totalizando 6 medições para cada meio. Para a rugosidade, duas placas de cada material com cinco mensurações cada foram utilizadas. A composição química resultante de cada tipo de tratamento foi investigada por difração de raios x em uma amostra por grupo de tratamento.

A despeito dos quatro meios diferentes, houve poucas diferenças, sem significância estatística, nos valores obtidos no ângulo de contato, sugerindo que qualquer um deles pode ser utilizado para ensaios de molhabilidade. No entanto, diferenças significativas foram encontradas em relação aos diferentes tipos de materiais e rugosidade resultante dos tratamentos de superfície. Para o Ticp, quando $\theta > 45^\circ$ a superfície apresentava um comportamento hidrofóbico em relação aos meios, com o aumento da rugosidade. Em contrapartida, quando $\theta < 45^\circ$ a superfície apresentava comportamento hidrofílico, com o aumento da rugosidade de modo linear. Nas ligas de titânio apenas quando $\theta > 45^\circ$ havia esse tipo de relação, enquanto em alguns casos (TiNi) o θ parece ser independente da rugosidade superficial. Os dois principais óxidos de superfície formados foram do tipo rutilico (TiO_2 tetragonal) e anatase (Lim et al., 2001).

A mudança na configuração do plasma gerado por catodo para anodo foi capaz de reduzir o ângulo de contato da água destilada em

superfícies de titânio, melhorando a molhabilidade e a adsorção de íons fosfato e cálcio. Os autores sugerem que o aumento na molhabilidade, neste caso, depende do acúmulo de elétrons na superfície e não do efeito de limpeza promovido por íons positivos e neutros gerados na configuração catódica (Shibata, Miyazaki, 2002).

Polímeros submetidos a plasma de O₂ por 3 minutos em corrente contínua apresentaram redução significativa no ângulo de contato da água em relação ao controle ($\theta = 54,2^\circ$ versus $\theta = 72,3^\circ$), enfatizando o comportamento hidrofílico da superfície, além de provocar aumento na rugosidade com alteração da estrutura normal do material (Chim et al., 2003).

Diferentes métodos de modificação de superfície podem originar topografias de aspectos distintos, com valores de rugosidade semelhantes e valores de molhabilidade diferentes. O exato papel da composição química de superfície e da topografia nos eventos iniciais da osseointegração em implantes dentários ainda não é consistentemente compreendido e exige inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro*.

2.3 O PROCESSO DE NITRETAÇÃO A PLASMA

O processo conhecido como nitretação iônica (ion-nitriding), nitretação em descarga luminosa (glow discharge nitriding) ou nitretação por plasma

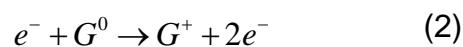
(plasma nitriding) foi patenteado em 1931 por J.J Egan nos EUA e em 1932 por Berghaus na Alemanha, mas somente em 1960 teve início o seu uso comercial (Santos, 1987). No Brasil, a técnica ainda não é muito conhecida tanto no meio empresarial como também entre metalurgistas e engenheiros de materiais, ficando sua divulgação restrita aos resultados de pesquisas desenvolvidas em universidades.

As Universidades pioneiras no Brasil, nesta área, iniciaram suas pesquisas entre 1985 e 1986. Enquanto a Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) dedicaram-se mais à pesquisa aplicada, como o aspecto microestrutural e mecânico da camada formada, a Universidade Federal de Santa Catarina preocupou-se mais com o aspecto teórico, como o diagnóstico do plasma e a influência das espécies sobre o mecanismo da nitretação. Mais recentemente, em 1991, construiu-se e instalou-se na Universidade Federal de São Carlos um equipamento para nitretação iônica com plasma pulsado.

O termo “plasma” se aplica a um gás contendo espécies neutras e eletricamente carregadas como elétrons, íons positivos, íons negativos, átomos e moléculas. Na média, um plasma é eletricamente neutro porque qualquer desbalanceamento de carga resultará em campos elétricos que tendem a mover as cargas de modo a restabelecer o equilíbrio. Como resultado disso, a densidade de elétrons mais a densidade de íons negativos deve ser igual à densidade de íons positivos. As cargas livres no plasma podem mover-se em resposta a qualquer campo elétrico e neutralizá-lo. Se

uma carga qualquer é inserida num plasma ou num campo é imposto, produzindo um potencial V_0 , as cargas livres, compostas de elétrons na grande maioria, se moverão formando uma blindagem elétrica, denominada **blindagem de Debye** (Alves Jr, 1995).

O plasma pode ser produzido em laboratório através da aplicação de uma diferença de potencial entre dois eletrodos. Quando uma diferença de potencial é aplicada entre dois eletrodos contidos num sistema hermeticamente fechado e a uma pressão suficientemente baixa, elétrons e íons são acelerados pelo campo elétrico, colidindo com outras partículas e produzindo assim mais íons e elétrons através da seguinte combinação (Alves Jr, 1985):



onde G^0 é o átomo ou molécula do gás no estado fundamental e G^{+} representa um íon deste gás. Devido a essa produção de cargas, uma corrente elétrica é gerada e varia com a diferença de potencial entre eletrodos. O catodo é a região mais importante no estudo da nitretação iônica porque é nele que se desenvolve a maioria dos eventos responsáveis pelas características da camada nitretada. Dentre estes eventos, destaca-se o Sputtering da superfície, a dissipação de calor pelo bombardeio das partículas, criação de defeitos na rede cristalina do catodo (peça), deposição de nitretos, adsorção e a difusão de nitrogênio (Alves Jr, 1995).

Um equipamento típico de nitretação iônica é constituído basicamente de um sistema de vácuo, uma fonte de potência e um reator. O esquema de vácuo deve ser capaz de atingir em torno de 10^{-2} torr de pressão e possuir

válvulas para controlar a vazão dos gases introduzidos para o tratamento. A fonte de potência possui uma saída CC, com voltagem máxima de aproximadamente 1500V, e uma corrente capaz de fornecer energia à peça, para que ela seja aquecida a uma temperatura entre 300 e 700° C (Alves Jr, 1995). No reator estão dois eletrodos onde o catodo é também o porta amostra. Ainda no reator devem existir saídas para medida da pressão, temperatura e outras variáveis desejadas para o melhor controle do processo. Devem ter ainda entradas para a atmosfera gasosa, bomba de vácuo e outros acessórios que sejam necessários para a nitretação da amostra.

O processo consiste em expor superfícies metálicas a um plasma nitretante, o qual é gerado devido a uma diferença de potencial entre dois eletrodos. Esses eletrodos estão contidos num reator hermeticamente fechado, onde é introduzida a atmosfera nitretante (tipicamente uma mistura de N_2-H_2 , a uma pressão entre 1 e 10mbar. Os íons criados devido a essa diferença de potencial, em torno de 600V bombardeiam a superfície da peça presa ao catodo, aquecendo-a até a temperatura de trabalho.

Para pressões baixas, a descarga possui um brilho de cor rósea de pequena intensidade que é característico do material do catodo (geralmente aço) e do gás. À medida que se aumenta mais a pressão, este brilho vai ficando mais intenso e mais localizado em torno do catodo, até que se atinge uma condição de descarga propícia para a nitretação.

Nestas condições, o plasma já está revestindo completamente o catodo e a peça a ser nitretada. Os íons deste plasma estão sendo

acelerados para a superfície do cátodo onde diversos efeitos ocorrem, dentre eles o aquecimento da peça devido ao bombardeamento pelos íons. A partir daí, é contado o tempo de duração do processo. Após este tempo, a fonte é desligada e a peça é deixada para resfriar naturalmente.

Uma extensão do processo de nitretação iônica é a nitretação em cátodo oco. Este método consiste em nitretar a peça numa atmosfera altamente ionizada. A alta ionização é conseguida porque os elétrons no plasma são obrigados a refletir sucessivamente entre duas superfícies catódicas. A Figura 1 ilustra esta situação. Elétrons são repelidos pelo cátodo central que pode ser a peça que se deseja nitretar em direção aos cátodos externos. Ao se aproximarem destes são também repelidos realizando, assim, um movimento de zig-zag que aumentará a taxa de ionização da região em questão. Uma alta densidade de íons significará maior bombardeamento na superfície, ocasionando alta incidência energética. Esta configuração de eletrodos é utilizada quando se deseja aumentar o dano superficial, ou seja, para uma mesma temperatura de processo, produzem-se mais defeitos na superfície que na nitretação iônica convencional ou planar (Alves Jr., 2001).

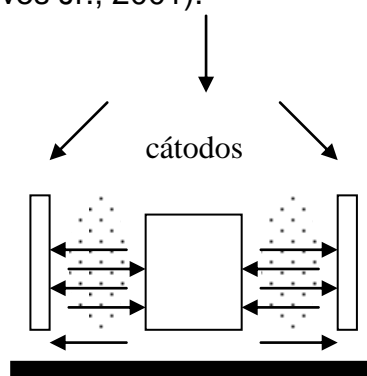


Figura 1 – Desenho esquemático de uma amostra na nitretação em cátodo oco

Nos últimos anos tem-se observado um grande crescimento de técnicas de tratamento de superfícies que são ambientalmente limpas. Dentre elas está a nitretação iônica, que consiste na deposição de nitretos em superfícies metálicas quando inseridas em plasma de nitrogênio. Além do fator ambiental, várias são as vantagens desta técnica sobre as convencionais. As mais importantes são: baixa temperatura de tratamento, melhor controle da espessura da camada, tempo de tratamento inferior, uniformidade na espessura da camada, nitretação de partes da peça (Ahmed, 1987; Alves Jr, 1995).

A técnica de nitretação a plasma de metais é um método bem estabelecido com inúmeras aplicações industriais devido a resultados peculiares nas características físicas e químicas dos materiais, como o aumento na dureza, resistência ao desgaste e oxidação, além de comprovada biocompatibilidade (Figuroa, Alvarez, 2006).

2.4 NITRETAÇÃO DO TITÂNIO

Os nitretos de titânio caracterizam-se pela combinação de algumas propriedades das cerâmicas: alto ponto de fusão (3160-3250°C), alta dureza (2500-3000 HV), estabilidade térmica e química, resistência ao desgaste e à corrosão, com algumas propriedades metálicas, tais como baixo coeficiente de atrito e alta condutividade térmica e elétrica (Mezger, 1992; Fouilland,

1998). Há vários nitretos de titânio, sendo que a literatura refere com mais frequência o TiN e o Ti₂N.

Suas propriedades são exploradas na produção de componentes mecânicos, no aumento da vida útil de ferramentas de corte e na tecnologia da micro-eletrônica. Sua semelhança em coloração com o ouro amarelo é considerada uma qualidade importante já explorada em relojoaria e tendo seu uso sugerido no recobrimento de superfícies metálicas de próteses odontológicas. O interesse da comunidade acadêmica é crescente em relação a estes compostos. Nos últimos anos, a odontologia, ortopedia e cardiologia têm investigado suas propriedades de resistência superficial e biocompatibilidade (Aronson, 1997).

Pesquisas sobre técnicas relatam que a nitretação em plasma e a carbonitretação são as técnicas de difusão com plasma mais usadas nas indústrias para o tratamento superficial de peças mecânicas. Os nitretos e carbetos de titânio são materiais duros que melhoram as propriedades tribológicas da superfície, ou seja, aumentam a resistência ao desgaste e dureza superficial (Ylbas, 1996).

O interesse pela aplicação de técnicas de modificação de superfície, especialmente a superfície do titânio c.p. e da liga Ti-6Al-4V pela medicina remonta à década de 1980. A liga Ti-6Al-4V é extensamente utilizada em prótese de joelho e fêmur desde a década de 1970. Ao longo dos anos 80 houve a constatação da falha em condições assépticas, de próteses de joelho e fêmur após longo período de uso. A inspeção dos tecidos que circundavam as próteses que falharam os mostrou com uma coloração

enegrecida. Este fenômeno foi creditado ao desgaste superficial do titânio e do polietileno que compõem a prótese. O atrito entre os componentes devido ao uso desgastou a superfície dos mesmos e danificou a camada protetora superficial de óxidos do titânio, fazendo com que partículas dos três componentes da liga e do polietileno se dispersassem nos tecidos. Embora não tenha sido verificado nenhum efeito tóxico sistêmico frente a estes elementos enegrecidos, sua presença levou à mobilização de células inflamatórias, especialmente macrófagos, que geraram a osteólise e perda asséptica dos implantes. Houve um consenso no sentido da necessidade de um tratamento superficial que reduzisse a baixa resistência ao atrito desta liga, preservando suas qualidades (Sovak, 2000).

Foram avaliados os efeitos dos parâmetros de nitretação relacionados às condições do plasma. As conclusões foram as seguintes: a concentração atômica de nitrogênio diminui com o aumento da distância relativa à superfície, mas aumenta com a temperatura, já que o raio de difusão do nitrogênio aumenta quando a temperatura da superfície e do substrato aumentam. A nitretação em plasma diminui o coeficiente de fricção, mas este aumenta abruptamente quando se rompe a resistência ao desgaste superficial. A microdureza mostrou variação similar no processo de nitretação, ou seja, ao aumentar a temperatura durante o processo há aumento conseqüente na microdureza. Os autores referem que após um pequeno tempo de nitretação a superfície fica levemente amarelada; aumentando-se o tempo esta se torna dourada e com longo tempo de nitretação, como 30 horas, a superfície da amostra torna-se escura. Nos

difratogramas os picos de nitrogênio são mais evidentes em temperaturas mais altas (Yilbas, 1996).

Em estudos referentes ao processo de CDV para a obtenção industrial de coberturas de TiN é usado há mais de 20 anos, porém a alta temperatura exigida no processo (1000°C) não é adequada às ligas odontológicas. Já a obtenção de TiN através de PVD exige o aquecimento do substrato a temperaturas que variam entre 200 e 500°C, tornando possível seu uso em Odontologia. A coloração da cobertura é dependente da quantidade de gás nitrogênio presente durante o processo (Mezger, 1992).

O processo de nitretação pode sofrer o efeito da geometria das amostras submetidas ao plasma. Cilindros de aço inoxidável de 8mm de diâmetro e comprimento de 1 a 10mm de altura foram submetidos ao plasma com atmosfera contendo N₂ 80% em pressões de 100 e 500 Pa por três horas. Nessas condições houve formação de uma camada de nitretos com espessura variada e dependente da altura da amostra. A espessura da camada aumentou com a altura das amostras, embora tenha havido decréscimo da camada nas amostras com 8 e 10mm de altura. Foi observada a formação de um anel de erosão relatado como efeito da distribuição da densidade de íons próximo às bordas das amostras. É possível haver variações na espessura da camada de nitretos de acordo com a conformação da amostra (Alves Jr et al., 2001).

A formação da camada de nitretos também é influenciada pelo tipo de processamento (oxinitretação, carbonitretação). Amostras submetidas a

atmosferas de nitrogênio, nitrogênio e ar e nitrogênio e metano em temperaturas de 800°C em 3, 6 e 12 horas de tratamento tiveram em comum a formação de camadas de nitreto TiN e Ti₂N na ordem de 15μm de espessura, identificadas por difração de Raios X (XRD). A adição de oxigênio diminui a dureza, embora mantenha boas propriedades anti-corrosivas. De modo geral, a nitretação aumenta a dureza, resistência à fricção e corrosão e o limite de fadiga de ligas de titânio (Sobiecki et al., 2002).

Estudo sobre nitretação de ligas de titânio usando plasma luminescente em corrente contínua comparando o efeito da mistura de gases do plasma, temperatura e tempo de tratamento revela que temperaturas da ordem de 900 °C aumentam a dureza da superfície. Ainda, esse parâmetro está aumentado quando se utiliza a mistura de Nitrogênio-Hidrogênio. A formação de camada de TiN de aproximadamente 50μm pode ser identificada pela difração de raios X, com conseqüente redução no coeficiente de corrosão (Lakshmi et al., 2002).

A nitretação a plasma de peças de aço e outros materiais está bem estabelecida, embora haja a necessidade de controlar as condições experimentais para se obter resultados reprodutíveis, como as condições de operação para cada tratamento, pois está claro que os parâmetros (voltagem, fluxo do gás, pressão de tratamento, limpeza da câmara e temperatura) podem variar, gerando resultados não uniformes relacionados a forma das amostras, tamanho e posição dentro do reator de plasma (Ataíde et al., 2003).

A técnica de nitretação em plasma na configuração de catodo oco foi introduzida recentemente para a modificação de implantes de titânio de uso clínico e amostras experimentais, por meio de um dispositivo que gera plasma altamente excitado e com densidade aumentada sob temperatura controlada. Foi desenvolvido um reator alimentado por fonte de alta voltagem em corrente contínua capaz de gerar influxo de elétrons a 1500V e 2A. (Alves Jr et al., 2006). Implantes cilíndricos foram submetidos a um plasma contendo a mistura de N₂ 20% e H₂ 80% em pressões de 150 e 250 Pa, temperaturas de 400, 450 e 500°C durante 1 e 2 horas. A caracterização de superfície mostrou que esse tipo de plasma é eficaz na formação de camadas de nitretos, principalmente TiN e Ti₂N e na alteração da topografia, produzindo rugosidade média variando de 0,2 a 0,8µm. Outro achado significativo foi a melhora na molhabilidade superficial em todos os grupos tratados, revelando que a nitretação em catodo oco é capaz de produzir superfícies hidrofílicas em condições controladas.

Uma alternativa ao plasma em configuração de catodo oco é a utilização da nitretação em gaiola catódica com o objetivo de homogeneizar as características de camada e reduzir o efeito de borda em amostras de geometria complexa. Neste processo, as amostras são envoltas por uma gaiola na qual um potencial elétrico é aplicado. A vantagem da técnica é a eliminação do efeito de borda, uma vez que o plasma é formado na gaiola e não diretamente sobre as amostras, além de reduzir a temperatura de tratamento, pois o calor irradiado da gaiola supre a quantidade de calor necessário para o aquecimento pré-tratamento (Alves Jr et al., 2006)

Cilindros de aço inoxidável foram lixados e polidos com alumina. Após limpeza com acetona em banho ultra-sônico, as amostras foram nitretadas por 3 e 5 horas em temperaturas de 500°C e 360Pa, nas configurações planar e gaiola catódica. A avaliação macroscópica revelou amostras de coloração homogênea por toda a superfície. Ambos os processos formaram camadas que variaram de espessura de acordo com o tempo de tratamento (18µm/5h e 5,2µm/3h). A espessura e morfologia da camada obtida não variaram na mesma temperatura de tratamento, eliminando o efeito de borda no grupo tratado na gaiola catódica em comparação aos inconvenientes da técnica anterior (Alves Jr et al., 2006).

2.5 RESPOSTA CELULAR A SUPERFÍCIES DE TITÂNIO MODIFICADAS

O titânio comercial puro (Ti cp) é o material de escolha para produção de dispositivos protéticos devido sua aceitação biológica no tecido ósseo, alta resistência à corrosão, peso comparado ao aço e ao fato de poder ser preparado em várias formas.

Os sistemas biológicos usados em testes de citotoxicidade *in vitro* podem ser cultura de órgãos, cultura de células ou organelas celulares. O modo mais amplamente utilizado para avaliar a toxicidade de materiais como o titânio é a cultura de células. Dois tipos são utilizados: linhagens celulares permanentes derivadas de bancos de células (ou comerciais) ou células

primárias derivadas de explantes e estabelecidas por cada laboratório de pesquisa. Em comparação com a experimentação animal e estudos clínicos em humanos, estudos *in vitro* apresentam vantagens pela possibilidade de controlar as condições experimentais, relativo baixo custo, rápida execução e isenção de questões éticas (Brunette,1988; Cooper et al., 1998; Brunette, 1999).

A principal limitação do método é a dificuldade em reproduzir as condições do ambiente *in vivo* e a extrapolação dos resultados para o paciente (Schmalz, 1994). Os testes de citotoxicidade medem o efeito finito sobre as células durante as primeiras 24-72 horas após a exposição das células a um agente desconhecido. Entretanto, muitas reações biológicas *in vivo* não são apenas citotóxicas e propagam-se além desse período (Hanks et al., 1996).

Os estudos de biocompatibilidade de novas superfícies de titânio focam na avaliação da resposta celular à superfície do material. Essa resposta é traduzida pelo processo de adesão, proliferação e diferenciação das células, embora a multiplicidade de modelos experimentais torne difícil a interpretação dos resultados.

O maior objetivo de um sistema de implantes tem sido produzir superfícies que promovam respostas desejáveis nas células e nos tecidos que estão em contato com o implante. A fixação de células no implante dental é um acontecimento complexo porque envolve três tipos distintos de tecidos: epitélio, tecido conjuntivo e tecido ósseo. A adesão de células na presença de soro é um processo multifatorial envolvendo adsorção de

moléculas de adesão do soro com moléculas do material, bem como o contato celular, fixação e espalhamento. A adsorção de proteínas ocorre rapidamente, formando uma camada de 2 a 5 nm no primeiro minuto de contato. O contato entre as células e o substrato provavelmente envolve a extensão de processos celulares que contém receptores de membrana especificamente direcionados para vários fatores de adsorção.

A fixação e espalhamento celular estão associados com o desenvolvimento de estruturas celulares específicas, identificáveis na microscopia óptica e eletrônica, (1) “closes contacs” podem ser considerados um modo de fixação para locomoção celular através do movimento do citoplasma marginal. (2) a habilidade das células em exercer uma força contrátil está associada com a “adesão focal” (estruturas grandes e permanentes) e com o “contato focal” (estruturas pequenas e transitórias). Algumas proteínas como as integrinas, presentes na membrana celular e especializadas em adesão da matriz extracelular também estão localizadas no “contato focal”. Assim, o “contato focal” e “adesão focal” podem ser considerados complexos de citoesqueleto da membrana especializada e altamente adesivos: (3) outro tipo de contato é a matriz extracelular, onde fibras desta parecem conectar a membrana do plasma com o substrato; (4) um quarto tipo de estrutura mediando a fixação celular é o hemidesmosomas (Kasemo,1998).

As células não se unem diretamente à superfície do material, mas através de moléculas de adesão como glicoproteínas extracelulares que são adsorvidas na superfície. Talvez a molécula de adesão mais estudada seja a

fibronectina, mas também têm sido identificadas outras como a lamina, epibolina, epinectina e vitronectina. As células têm diferentes integrinas que podem se unir especificamente a diferentes moléculas de adesão (Kasemo, 1998).

As propriedades do material que afetam a resposta celular incluem rigidez, molhabilidade e topografia superficial. Molhabilidade é a medida do ângulo de contato crítico formado pelo espalhamento de uma gota de líquido em uma superfície. Este dado pode ser expresso em tensão superficial crítica (dinas/cm^2). O material com tensão superficial crítica de 20 a 30 dinas/cm^2 exibe mínima adesividade biológica. A textura superficial em um implante tem o potencial de selecionar certas populações celulares e alterar suas funções, por exemplo, fibroblastos se acumulam em superfícies lisas, enquanto os macrófagos preferem superfície rugosa, comportamento denominado de rugofilia. Para descrever o movimento celular direcional que ocorre como resultado de gradientes de adesividade no substrato usa-se o termo "haptotaxis". Então, a migração mediada por constituintes de adesão celular da matriz extracelular ocorre por movimento haptotático, em função do comportamento celular na interface tecido-implante (Brunette, 1988). A inserção de um implante produz um possível gradiente de adesividade que pode variar entre os diferentes tipos de células ou da matriz extracelular. Desta forma seria esperado que células preferissem aderir umas às outras ou à matriz extracelular do que à superfície de um material com baixa energia superficial (material com pobre adesividade), assim, esta situação resultaria em formação de cápsula fibrosa (Brunette, 1988).

Outro evento importante é a deposição de um “filme condicionador glicoproteico” que, por sua vez, depende de dois fatores: da textura, com sua propriedade de embricamento celular e da energia de superfície, com sua propriedade de adsorção molecular (Brunette,1988).

A adsorção protéica ocorre rapidamente, com a formação de uma camada de 2 a 5 nm, no primeiro minuto após o contato com sangue. Como regra geral, as células não se aderem diretamente às superfícies dos materiais e sim à camada glicoproteica extracelular que está adsorvida na superfície do implante. Dentre as várias macromoléculas capazes de promover aderência celular, as mais estudadas são: fibronectina, laminina, epibolina, epinectina, osteopontina, moléculas colágenas e vitronectina (Baier, 1986).

O uso do plasma como meio de modificação de superfícies de titânio é estudado há algum tempo. A aplicação de plasma de argônio com o objetivo de esterilização do titânio revelou um aumento significativo da molhabilidade. O ângulo de contato foi reduzido em todos os grupos ($\Theta < 20^\circ$) comparado ao grupo não tratado ($\Theta = 62^\circ$) e ao plástico ($= 61,5^\circ$). Embora tenha sido identificada a presença de contaminantes inorgânicos, houve aumento da adesão de osteoblastos nas superfícies expostas ao plasma por 1 minuto (Swart et al., 1992).

Amostras de materiais utilizados em próteses ortopédicas (Ti e cromo-cobalto) foram submetidas à cultura de osteoblastos humanos para avaliar se o substrato poderia influenciar na adesão celular. As amostras foram submetidas a tratamentos de superfície idênticos, polidas com lixa de

carbeto de silício de granulação 600. Os resultados indicaram que a superfície de titânio favoreceu a adesão e diferenciação celular (Sinha et al., 1994).

Discos de titânio submetidos a lixamento e passivados com ácido nítrico a 40% apresentaram fraca adesão de osteoblastos obtidos de mandíbula de fetos bovinos. As células formaram multicamadas de matriz em mineralização separadas da interface do titânio. Áreas de mineralização foram observadas a partir da segunda semana de modo homogêneo sobre a superfície do disco (Yliheikkiä, 1995).

O efeito de diferentes tipos de tratamento sobre discos de titânio comercialmente puro (Ti cp) grau II, revelou que a adesão, proliferação e diferenciação de células derivadas de osteossarcoma humano (MG63) foram afetadas pelo grau de rugosidade do material, assim como a morfologia celular. Em superfícies com valores de média de altura do perfil (Z_m) entre 5.02 e 10.31 μm os osteoblastos formaram uma monocamada homogênea de células achatadas dispersas em matriz extracelular depositada. À medida que o valor de Z_m aumentava, as células, embora distribuídas de maneira uniforme, não formavam monocamadas, com algumas apresentando filopódios que denotam o contato com a superfície por adesão focal (Martin et al., 1995).

Ainda, no estudo descrito por Martin et al., (1995), o número de células aderidas à superfície em 24 horas foi maior em superfícies menos rugosas, semelhantes ao controle – poço de plástico da placa de cultura. Após 48 horas, apenas superfícies TPS (titanium plasma spray) com valores

de 18 μm , continham significativamente menos células do que a superfície plástica. Entretanto, após uma segunda tripsinização, as superfícies mais rugosas liberaram maior quantidade de células, sugerindo uma correlação direta entre a rugosidade e o número de células presas na estrutura tridimensional do disco.

Hipóteses foram estabelecidas para avaliar se o aumento na rugosidade de superfície causa aumento na deposição de cálcio, fósforo e na produção de proteína por osteoblastos obtidos de explantes primários de tibia de rato. A adsorção de compostos inorgânicos ocorre durante a imersão em soluções fisiológicas independente do tipo de superfície. Cálcio e fósforo são depositados em maior quantidade após a primeira semana, indicando o início da mineralização da matriz extracelular. Os osteoblastos sobre superfícies lisas assumiam a forma arredondada, ao passo que em superfícies rugosas aparecem alongados e seguindo a direção dos sulcos causados pelo lixamento. Conclui-se que a textura da superfície pode influenciar a morfologia celular (Ong et al., 1996).

Osteoblastos MG63 foram utilizados para avaliar o efeito da rugosidade e da composição química do titânio comercial puro (Ticp) e da liga TiAl_6V_4 usando discos polidos e jateados com grânulos de alumina (Al_2O_3). A rugosidade exerceu efeito estimulatório na proliferação e diferenciação celular, notadamente no Ti puro. A adesão foi mais pronunciada no plástico em comparação às superfícies de titânio. O estudo comprovou que a composição química desempenha papel fundamental, uma

vez que a atividade da fosfatase alcalina foi maior em superfícies de titânio puro do que na liga (Lincks et al., 1998).

Estudos *in vitro* indicam que a rugosidade superficial é um parâmetro importante que influencia a resposta biológica inicial de células em superfícies de titânio modificada. Discos de titânio grau II foram submetidos a lixamento com granulações variando de 220 a 4000 para avaliar a adesão e diferenciação celular de células de medula óssea de ratos. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para determinar o efeito da rugosidade na morfologia celular enquanto a composição química da matriz mineralizada e da estrutura cristalográfica foram avaliadas pela difração de raios X. De modo geral, as células aderiram às três diferentes superfícies e elaboraram matriz extracelular por volta do 15^o dia de cultura, sem nenhuma evidência de que a rugosidade aumentou a deposição de proteínas da matriz extracelular. Dois padrões morfológicos foram encontrados nas superfícies: esférico e achatado. Células esféricas e exibindo mitose foram observadas na primeira semana de cultivo (Castellani et al., 1999).

O método de esterilização é um fator importante nos estudos de biocompatibilidade, uma vez que a temperatura parece alterar as características de superfície do material.

Um estudo foi conduzido com o objetivo de investigar o efeito do calor de tratamento de superfícies de titânio na adsorção de proteínas e na resposta de osteoblastos *in vitro*. Discos de titânio grau II foram tratados com lixas 600 e passivados em ácido nítrico a 40% em temperatura ambiente por 30 minutos. Metade das amostras foi exposta a temperaturas de 750 °C por

90 minutos. Todas as amostras foram então esterilizadas em luz ultra-violeta por 24 horas. Para determinar a estrutura cristalográfica das amostras, foi aplicada a difração por raios X em 20 a 70° em 2 θ a velocidade de 0,1° por minuto. Cinco amostras por grupo foram selecionadas para medição do ângulo de contato com água destilada (Bess et al., 1999).

Altas temperaturas são capazes de alterar a estrutura cristalina da camada superficial do titânio com a conversão da camada amorfa de óxido para o TiO₂ rútilico ao ser exposto a 750 °C. Isto tem efeito na molhabilidade, pois o ângulo de contato é menor do que em amostras não expostas ao calor ($\theta=32$ versus $\theta=47,7$) e no comportamento celular, uma vez que a produção de proteína e a atividade de fosfatase alcalina são maiores nessas superfícies (Bess et al., 1999).

Ligas de titânio utilizadas para a fabricação de material ortopédico foram submetidas a diferentes tratamentos de superfície para avaliar quantitativamente a adesão de osteoblastos humanos nessas superfícies e as proteínas expressas em função da rugosidade da superfície. A adesão e proliferação celulares são menores em superfícies menos organizadas enquanto a matriz extracelular é melhor organizada e orientada em superfícies lisas. Há poucas diferenças na deposição de fibronectina, osteopontina e colágeno tipo I entre as diferentes superfícies. A proliferação diminui com o aumento da rugosidade média (R_a), enquanto foi maior em superfícies com valores de R_a entre 0,16 e 0,30 μm (Anselme et al., 2000).

Ainda, a resposta de osteoblastos de medula óssea humana a ligas de titânio TiAl₆V₄ com três valores distintos de R_a (0,32, 0,49 e 0,87 μm),

mostra que adesão e proliferação são sensíveis a R_a e aumentam a medida que a rugosidade aumenta. As superfícies dos discos de titânio foram obtidas por lixas de carbetto de silício de modo unidirecional resultando em sulcos com orientação paralelos no sentido longitudinal. As células formaram pontes através de ondulações e se espalharam na superfície sem diferenças aparentes na morfologia celular. Como o tamanho do osteoblasto é maior do que a distância entre dois sulcos adjacentes, os resultados sugerem que células osteogênicas podem reconhecer alterações de rugosidade da ordem de 0,6 μm . Os osteoblastos expressaram fosfatase alcalina de modo semelhante nas três superfícies (Deligianni et al., 2001).

Considera-se que a adsorção de proteínas séricas seja um dos primeiros eventos a ocorrer na superfície de um material em contato com tecidos vivos. A natureza dessas proteínas é dependente das propriedades de superfície. A albumina e fibronectina adsorvidas de soro bovino respondem de modo diferente a variações de R_a , com a albumina sendo adsorvida preferencialmente em superfícies lisas e exercendo um efeito inibitório na adesão celular, enquanto a fibronectina é adsorvida preferencialmente em superfícies rugosas, favorecendo a adesão (Deligianni et al., 2001).

Naturalmente tenta-se estabelecer a rugosidade ideal que favoreça a adesão, proliferação e diferenciação celular. Discos de titânio jateados com partículas de TiO_2 de 90, 180 e 300 μm apresentam superfícies com distintos valores de R_a . A adesão de osteoblastos mandibulares humanos guarda relação com o aumento na rugosidade, embora o jateamento com partículas

de 300µm não corresponda a aumento adicional na adesão e nem na morfologia celular com aparência achatada e espalhada em todos os tipos de superfície (Mustafa et al., 2001).

Implantes comerciais com diferentes tratamentos de superfície (liso, jateado com TiO₂, TPS e revestido com hidroxiapatita) foram expostos a explantes primários de calvária de ratos para determinar o efeito da superfície na adesão e morfologia celular. As células foram categorizadas em 4 estágios, sendo o estágio 1 caracterizado por células ovais com poucos filopódios, que progridem com extensões citoplasmáticas focais ou lamelopódios (estágio 2), espalhamento circunferencial (estágio 3) e espalhamento com formato achatado poligonal (estágio 4). Observa-se que um número similar de células aderem as diferentes superfícies, à exceção de implantes revestidos com hidroxiapatita, com poucas células aderidas. A superfície de plasma spray de titânio (TPS) favorece o espalhamento celular, enquanto nas outras superfícies isto ocorre de modo mais lento. Ainda, a forma da célula reflete a textura do substrato (Lumbikanonda, Simmons, 2001).

A topografia da superfície pode alterar o modo como o citoesqueleto da célula se organiza e se direciona em substratos de titânio com rugosidades diferentes. Fibroblastos gengivais de quinta a sétima passagem foram semeados sobre os discos por 48 horas. As células aderidas guiadas por contato dependem do valor médio da altura pico-vale (R_a). Mesmo em superfícies polidas, onde as células não têm nenhuma estrutura para poder se alinhar, 11% das células está por definição, alinhada em qualquer

direção. A adesão de células MC3T3 é mais forte pela formação de contatos focais (fibras de *stress* de actina) em discos com sulcos do que nas superfícies não texturizadas e polidas (Eisenbarth et al., 2002).

Osteoblastos obtidos de calvária de rato respondem de modo distinto a superfícies de titânio com composição química modificada. A presença de hidroxiapatita revestindo ligas de titânio impede o crescimento e a viabilidade celular de células Osteo-1. Entretanto, este revestimento aumenta a formação de matriz extracelular. As células apresentam morfologia achatada e poligonal com processos citoplasmáticos partindo do corpo celular independente do substrato onde foram semeadas (Layos-Valereto et al., 2002).

Ainda acerca da rugosidade do titânio, observa-se que a rugosidade deve ser considerada não apenas em termos de amplitude, mas também em termos de organização. Há melhor adesão e proliferação de osteoblastos obtidos de crista ilíaca humana em superfícies com microrugosidade, baixa repetibilidade e valores maiores de R_a e R_z . Nos sulcos de maior periodicidade, as células adotam forma poligonal, enquanto em superfícies mais caóticas as células adotam um padrão fusiforme (Anselme et al., 2002).

A despeito do longo uso de metais como implantes ortopédicos, ainda há problemas com esses materiais no ambiente biológico. Osteoblastos humanos semeados em Ticp, ligas, aço inoxidável e liga de cromo-cobalto com superfícies semelhantes às aquelas de uso clínico revelam que as células aderem, proliferam e formam nódulos mineralizados em todos os substratos. Nas superfícies lisas as células exibem forma achatada e apenas pequenas

diferenças são observadas nas superfícies com composições químicas distintas. Entretanto, nas ligas de titânio rugosas, a diferenciação ocorre em menor tempo, sugerindo um efeito positivo da rugosidade na diferenciação celular (Schimidt et al., 2002).

Discos de titânio ($\text{TiAl}_6 \text{V}_4$) com cinco tipos de topografia submetidos a testes *in vitro* com células pré-osteoblásticas derivadas de calvária de rato MC3T3 revelam que há variações na expressão de proteínas de adesão analisadas por imunofluorescência, onde a actina é expressa no citoesqueleto, vinculina nas áreas de adesão focal e fibronectina e colágeno tipo I na matriz extracelular. Existe uma correlação significativa entre a rugosidade superficial e o crescimento celular, sendo que a proliferação e o espalhamento dos osteoblastos pela amostra é maior em superfícies mais lisas. Nos discos tratados com jateamento de areia ($R_a= 0,62 / R_t= 8,76$) as células apresentam formato esférico, com poucos prolongamentos citoplasmáticos, enquanto nas superfícies polidas ($R_a= 0,16 / R_t= 1,46$) tornam-se achatadas com prolongamentos e finas extensões do citoplasma em múltiplas direções (Linez-Bataillon et al., 2002).

A adesão celular e diferenciação são induzidas por proteínas séricas como a fibronectina, que adsorvem a superfície do titânio. Placas polidas com alumina e submetidas ao plasma de argônio por 1 minuto em descarga luminescente (glow discharge plasma) a baixa pressão foram submetidas a culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3 em meios com e sem soro. A adsorção de fibronectina foi medida nos dois meios. O estudo revelou que a adesão celular é positivamente influenciada pelo soro, comprovando o papel

das proteínas na adesão celular e que esta foi significativamente aumentada no grupo tratado em plasma. O efeito foi atribuído à limpeza da superfície e ao aumento da molhabilidade promovido pelo plasma (Shibata et al., 2002).

A adesão e proliferação celular em superfícies de titânio é um evento maior no processo de osseointegração de próteses metálicas intra-ósseas. Um estudo investiga os parâmetros de rugosidade, energia livre de superfície e hidrofobicidade de substratos de titânio e sua relação com o comportamento de fibroblastos humanos em cultura. A molhabilidade da superfície investigada pela técnica da gota séssil revela que superfícies com alta polaridade e energia superficial têm um efeito positivo na adesão e proliferação em amostras de Ticp e Liga de níquel-titânio (TiNi). Valores de rugosidade referentes às distâncias pico-vale (R_z) de todas as amostras têm correlação com a proliferação celular e quanto maior a rugosidade, menor a proliferação (Ponsonnet et al., 2003).

Osteoblastos obtidos de explantes primários de calvária de ratos e expostos a discos de titânio puro e liga, polidos com alumina de partículas variando de 25 a 250 μ m e esterilizados em autoclave não apresentam diferenças na adesão celular em duas horas de avaliação. Os diferentes tratamentos geram superfícies com valores de R_a diferentes, embora não sejam observadas diferenças significativas na adesão, proliferação e proteínas totais. A atividade de fosfatase alcalina e formação de nódulos mineralizados, característicos da diferenciação celular, são afetados pela natureza química do substrato, mas não pela rugosidade, sendo maior no Ticp (Rosa, Beloti, 2003).

Em outro experimento, a adesão de osteoblastos foi avaliada considerando o tempo de avaliação em 4 e 24 horas após serem semeadas em discos de titânio com diferentes rugosidades. A adesão não é afetada pela rugosidade em nenhum dos tempos de avaliação, mas é maior em 24 horas (Xavier et al., 2003).

A topografia de superfície pode afetar a função e estrutura celular dos osteoblastos. Superfícies com valores de $R_a=6.07\mu\text{m}$ bombardeadas com partículas de corundum (óxido de alumínio) apresentam bordas agudas que inibem a formação de estruturas fibrilares de tensina, afetando a organização do citoesqueleto de células MG63. Como consequência, observa-se a redução na mineralização, atribuído ao tipo de superfície (Nebe et al., 2004).

A variação na faixa de rugosidade e sua influência na adesão celular mostra que existe um predileção por superfícies com valores intermediários e R_a . Discos de titânio polidos com partículas de alumina de diferentes tamanhos geram superfícies com rugosidades que variam de 0,05 a 1,20 μm com grande influência na adesão de células U-2OS após duas horas de incubação. Amostras com $R_a = 0,15 \mu\text{m}$ tem a melhor adesão e espalhamento quando comparadas com superfícies mais lisas ($R_a=0,05$) ou mais rugosas ($R_a= 0,3$ e 1,20 μm) (Huang et al., 2004).

A diferenciação de osteoclastos em placas de titânio tratadas com e sem plasma revela que aumento da energia livre de superfície, produzida pelo plasma de argônio em descarga luminescente afeta a diferenciação de osteoclastos sobre placas de titânio. A adsorção de proteínas do soro é

maior nas placas tratadas no plasma sugerindo que as proteínas da matriz extracelular estão diretamente relacionadas ao processo de diferenciação celular e esta é beneficiada por este processo de modificação de superfície (Kawai et al., 2004).

A adsorção de componentes inorgânicos no meio de cultura favorece a ligação e adsorção de proteínas da matriz extracelular sobre superfícies metálicas. Observa-se que há aumento significativo na adsorção de sódio nas superfícies de titânio tratadas em plasma anódico de argônio e isso induz a maior adsorção de fibronectina sobre o material (Yamamoto et al., 2005).

Os efeitos da composição química do material, composição química da camada superficial e a topografia são largamente estudados em culturas de células osteoblásticas. Quando comparadas amostras experimentais de Ticp, liga de titânio e aço inoxidável submetidas a seis diferentes processos de modificação de superfície obtendo duas amplitudes de R_a , demonstra-se que nem a composição do material nem a topografia exercem efeito significativo na resposta de osteoblastos humanos. Entretanto, ao se revestir as amostras com uma fina camada de ouro-paládio, modificando a composição química da superfície, observa-se um decréscimo na adesão celular na maioria dos substratos, exceto no grupo tratado por jateamento e ataque com ácido sulfúrico e neste caso é demonstrado que o tipo de processamento pode, de algum modo, influenciar a adesão celular pela morfologia e composição química da superfície (Anselme, Bigerelle, 2006).

O titânio possui estruturas policristalinas com diferentes orientações que são identificadas por difração de raios X. As propriedades físicas desse material dependem da distribuição e orientação dos cristais. Células pré-osteoblásticas MC3T3 expostas a amostras de $Ti_{60}Al_{36}V_4$ com duas orientações cristalográficas sugerem que a adesão e a proliferação celular sofrem efeito da orientação tridimensional dos cristais e que o tipo de processamento é determinante dessa modificação (Faghihi et al. 2006).

Observa-se que superfícies de titânio ionizadas em plasma em resíduos de gases no vácuo por 60 minutos induzem a maior confluência e adesão de osteoblastos, quando comparadas a amostras não ionizadas. Os osteoblastos aderidos apresentaram morfologia mais achatada do que no grupo controle. A energia dos íons depende da voltagem da descarga elétrica e o tempo de exposição no plasma influencia na resposta celular (Abidzina et al., 2007).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo avaliar as características físicas e químicas de superfícies de titânio modificadas por nitretação a plasma e o efeito na adesão e proliferação de células pré-osteoblásticas *in vitro*.

O protocolo de pesquisa foi submetido à apreciação e aprovado pela Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa- CAPPesq (nº 620/05) e pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Setenta e oito discos de titânio grau II ASTM F86, nas dimensões de 15mm de diâmetro por 1,5mm de espessura foram lixados gradualmente com lixas de SiC, de abrasividade 220, 360, 400, 600, 1000, 1200 e 2000 em água corrente. Foram depois polidas (politriz AROTEC, modelo APL-2 e série 212560, BRASIL) com pano de polimento OP-CHEM, sílica coloidal (SiO₂) com partículas de 0,1µm (ATM-GMBH, Alemanha) e água oxigenada (H₂O₂) 20V até um acabamento final de 0,04µm.

As amostras polidas foram limpas em banho de ultra-som com acetona por 10 minutos, com objetivo de remover contaminantes que pudessem interferir no processo de nitretação iônica. As amostras foram secadas em temperatura ambiente e acondicionadas em placas de cultura até a nitretação.

4.2 PROTOCOLO DE NITRETAÇÃO

Após o polimento, as amostras foram colocadas em uma câmara de aço inoxidável (reator), com 400 mm de diâmetro e 400 mm de comprimento, hermeticamente fechada, para receber o tratamento de superfície (Fig.2). Foram utilizadas duas configurações no reator de plasma, nitretação em gaiola catódica e planar (Figs. 3 e 4, respectivamente).

A gaiola foi produzida a partir de titânio puro grau II, em dimensões de 76mm de diâmetro por 25mm de altura, com uma cobertura removível. A espessura da parede é de 0,8mm, com furos de 7,6mm de diâmetro e distância entre os centros dos furos adjacentes de 9,2mm. Nesta configuração um isolante foi posicionado sobre o porta-amostra para garantir a mesma distância do topo e da lateral da gaiola.

Internamente, a câmara possui um eletrodo em forma de disco, sobre o qual é colocada a amostra (Fig. 2). Inicialmente foi feito um vácuo no reator até uma pressão de 10^{-1} mbar e então se introduzia hidrogênio com um fluxo de 12sccm, como gás de arraste de impurezas, até uma pressão de 1,6 mbar por 20 minutos. Após essa etapa, introduziu-se o N_2 a 3sccm até conseguir uma atmosfera de trabalho estável em torno de 680V, 0,5 miliampére (mA), temperatura de 450°C e pressão de nitretação de 2,5mbar. Nessas condições as amostras foram nitretadas por 60minutos. O protocolo de nitretação foi utilizado de acordo com o preconizado por Alves Jr (2001, 2006).

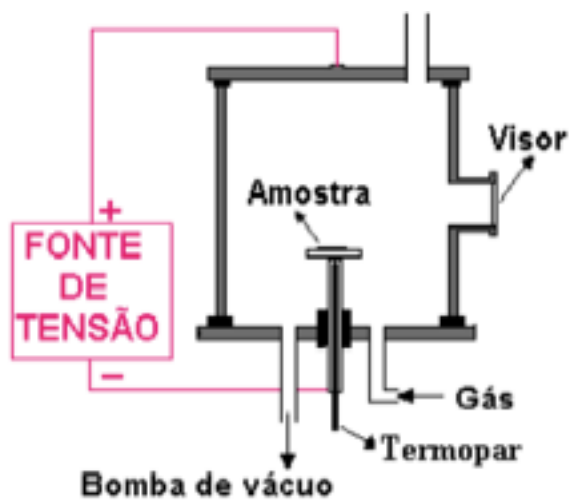


Figura 2 - Reator de plasma

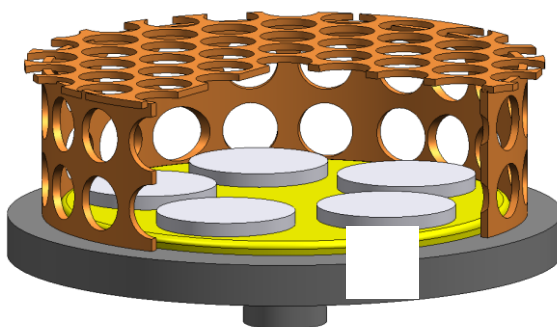


Figura 3 - Configuração de nitretação em gaiola catódica

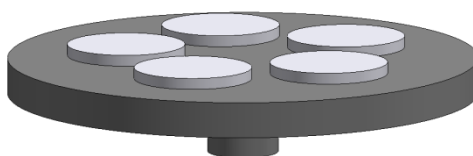


Figura 4 - Configuração de nitretação em modo planar

As atmosferas do plasma foram configuradas obedecendo a um fluxo de gases de 15sccm (tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros de tratamento com plasma de nitrogênio

Grupo experimental	Configuração do reator	Atmosfera do plasma	Tempo tratamento	Pressão do plasma	Temperatura do plasma	Fluxo do gás total
I (polidas)	-	-	-	-	-	-
II	Planar	N _{20%} H _{80%}	1h	2,5mbar	450°C/17.5mA	15sccm
III	Gaiola catódica	N _{20%} H _{80%}	1h	2,5mbar	450°C/17.5mA	15sccm

Depois de terminado o tratamento de superfície, as amostras foram seqüencialmente submetidas a ensaio de caracterização superficial, como descrito a seguir.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.3.1 Fases superficiais

Para análise das fases superficiais foi utilizado um difratômetro de raios X Shimadzu modelo XRD-6000. Duas amostras foram analisadas com ângulos de varredura entre 30 e 80⁰, passos de 0,002⁰ e tempo de 3 s por passo numa velocidade de 1⁰/min.

4.3.2 Textura superficial

Uma amostra de cada grupo foi submetida à microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise das características de textura superficial (JEOL – JSN 6060, 10-20 KeV) em ampliações de 40, 100 e 200 vezes.

4.3.3 Rugosidade

Para análise da rugosidade foi mensurado o parâmetro Ra em seis amostras de cada grupo, utilizando um rugosímetro modelo SURTRONIC 3, (Taylor-Hobson Inc, USA) com *cut-off* igual a 0.25. As medidas foram tomadas em três direções diferentes, em ângulos de aproximadamente 120° com dispersão nestas três direções inferior a 10%.

Três amostras de cada grupo foram submetidas a análise da topografia em um microscópio de força atômica modelo Shimadzu (SPM 9500J3) em ampliações de 50x50 micra e 37,5x37,5 micra. As medidas de rugosidade foram feitas considerando-se quatro direções diferentes da amostra, variando-se os ângulos de medida em 45° em uma mesma imagem. Os valores de rugosidade representam a média das quatro medidas.

4.3.4 Molhabilidade

Após o tratamento a plasma, cinco amostras de cada grupo experimental foram submetidas ao ensaio de molhabilidade. A técnica utilizada foi a determinação do ângulo de contato estático, ou técnica da gota séssil, para cada uma das amostras, mensurada por dois observadores. As amostras foram colocadas em uma superfície plana e utilizando uma micropipeta digital de volume ajustável com uma solução fisiológica, posicionada de forma perpendicular e muito próxima à superfície foi depositado 0,25ml da solução sobre a superfície da amostra.

De forma a padronizar o teste e por serem gotas muito pequenas, foi feito acompanhamento da mudança do ângulo por 01 seg., 30 seg. e 60 seg.

4.4 ENSAIOS DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Após a exposição ao plasma, 45 amostras foram acondicionadas em placas de cultura de 24 poços de 2cm² de área e esterilizadas por radiação gama. A dose total de radiação por amostra foi de 25 kGy, liberada a uma dose média de 8,993 kGy/h (2h 46minutos a uma distância de 50mm), em irradiador GAMMACELL 220 Excel (MDS Nordion, Ca).

Para os experimentos de adesão, foram plaqueadas 1×10^4 células /cm² por poço, da linhagem MC3T3 após a oitava passagem, sobre todas as placas, totalizando 36 discos divididos em três grupos experimentais: Grupo I (Titânio polido); Grupo II (20%N₂:80%H₂ - 1h em modo planar); Grupo III (20%N₂:80%H₂ - 1h em gaiola catódica). Três amostras de cada grupo foram aleatoriamente selecionadas para análise da morfologia celular. Quatro poços de cada placa foram utilizados como controle. As células foram semeadas em triplicatas em todos os grupos.

A proliferação celular foi analisada através das contagens do número de células aderidas às amostras, nos diferentes tempos experimentais (1, 2 e 3 dias) de todos os grupos, em triplicatas. Estes dados foram utilizados para a obtenção das curvas de crescimento celular dos diferentes grupos experimentais.

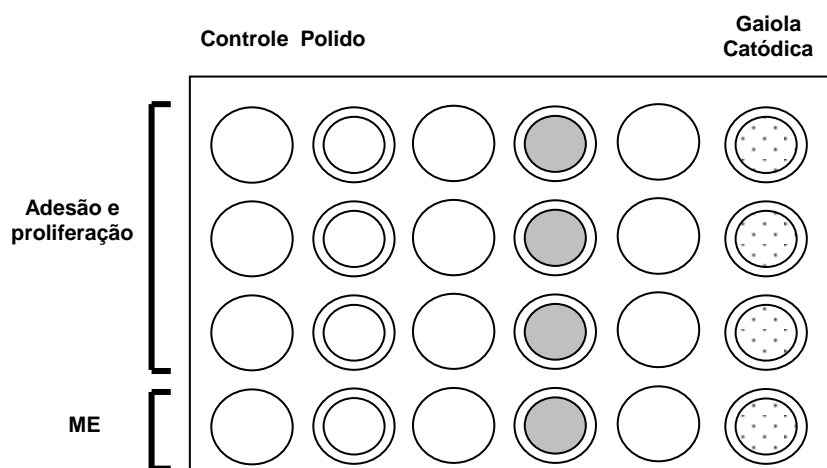


Figura 5 – Desenho do experimento com cultura de células de acordo com os grupos

4.4.1 Curva de crescimento e viabilidade celular

Trinta e seis poços foram contados por 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. O número de células viáveis colhido de cada Flask foi obtido pela contagem de células viáveis através do uso de hemocitômetro e o método da exclusão de células coradas pelo azul de trypan (FRESHNEY, 2000). O número total de células originárias do frasco foi obtido através da seguinte equação matemática: Número total de células contadas x diluição x 10^4 / Número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem.

Finalmente, o percentual de viabilidade da população celular foi obtido dividindo-se o número total de células viáveis pelo número total de células e o resultado, multiplicado por 100.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Uma amostra de cada grupo experimental foi fixada em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M por 2 horas à temperatura ambiente. A pós-fixação se deu através de solução de tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol em série crescente, imersas em hexametildisilazane

(HMDS) por 30 minutos e secas no ar dentro da capela. Para análise por microscopia eletrônica utilizou-se um microscópio JEOL 6100. As amostras foram revestidas com ouro por “sputtering”, cuja espessura final estimada foi de 10nm. Todas as amostras foram fotografadas no microscópio eletrônico de varredura com distância focal de 20mm e aumento de 40 e 500X. Foram obtidas eletromicrografias com o objetivo de abranger as mesmas áreas de todos eles.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise não paramétrica. A existência de diferenças significativas entre cada tipo de tratamento de superfície foi identificada mediante análise da média dos postos e separatrizes. Cada dado das contagens celulares corresponde à média \pm sem (desvio padrão da média) de 4 amostras por grupo. As diferenças entre os grupos foram comparadas pelo método Kruskal-Wallis para dados não relacionados entre si e pelo teste de Friedman para dados do mesmo grupo. O nível de significância foi de 5% ($p \leq 0,05$), com 95% de confiança.

5 RESULTADOS

5.1 COMPOSIÇÃO DE CAMADA

A composição da camada superficial avaliada pela difração de raios X revelou a presença de óxido de titânio em todas as superfícies e a formação de nitreto de titânio nas amostras submetidas ao plasma, embora não tenha sido possível caracterizar fases Ti_2N de acordo com a figura 6.

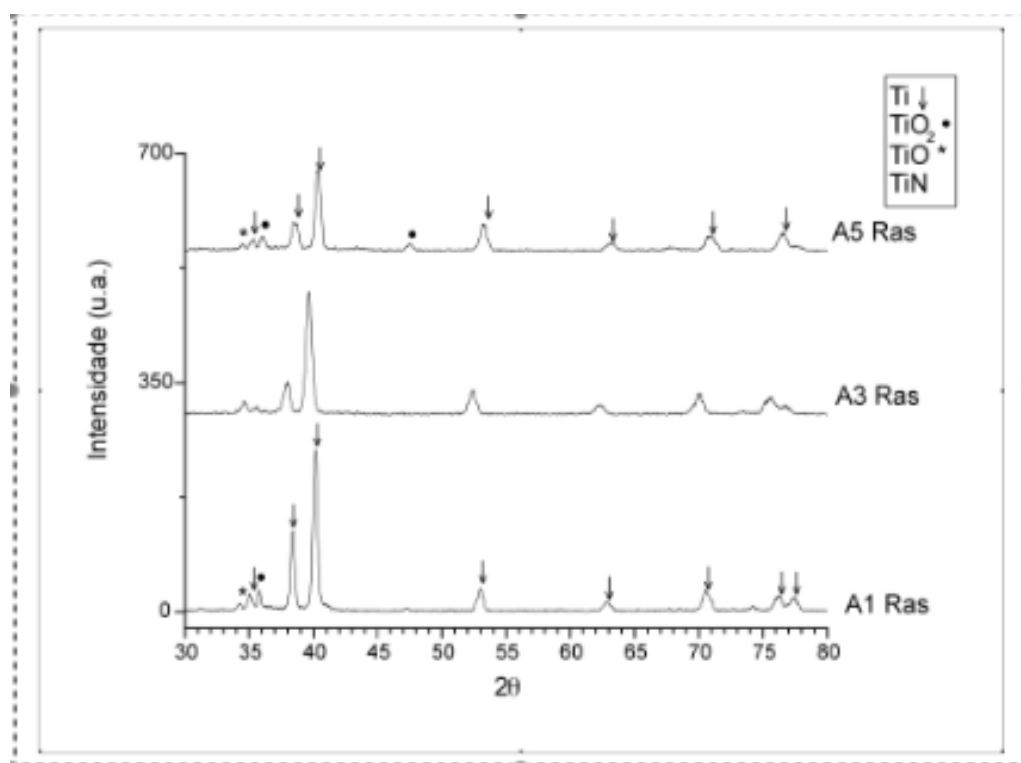


Figura 6 - Difratoograma de rX das amostras em diferentes condições de tratamento em 2θ

5.2 TEXTURA SUPERFICIAL

Uma amostra de cada grupo foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com a finalidade de observar a textura da superfície após o tratamento. Os três grupos apresentaram texturas de superfície distintas, embora o tratamento por gaiola catódica tenha criado microgranulações uniformemente distribuídas pelo disco. (Fig. 7)

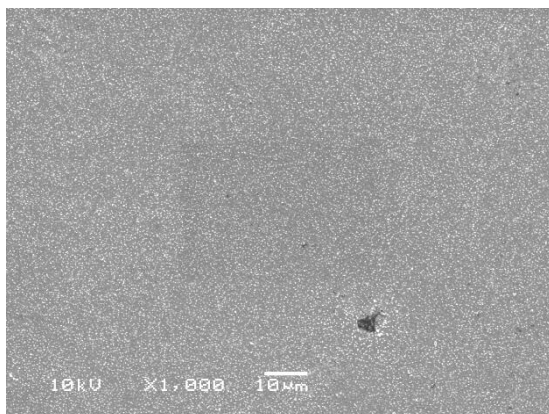


Figura a. gaiola catódica

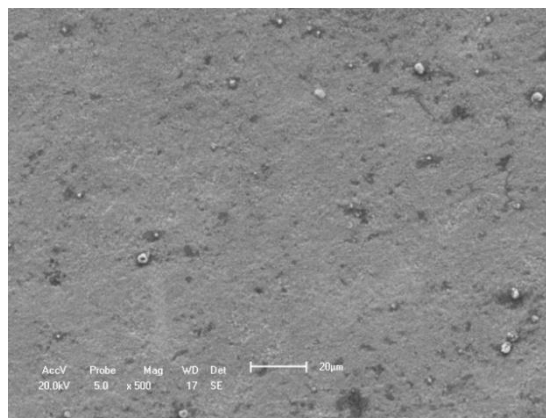


Figura b. planar

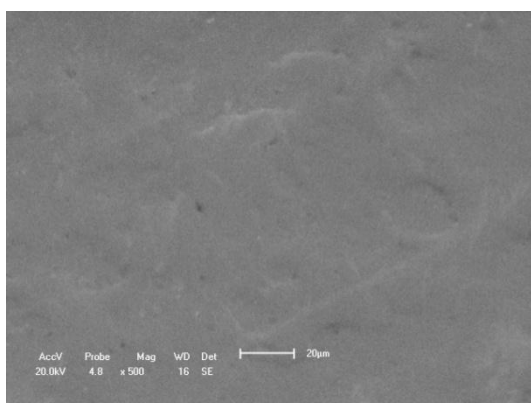


Figura c. polida

Figura 7 - Textura de superfície das diferentes condições de tratamento por microscopia eletrônica de varredura

A topografia analisada por microscopia de força atômica (fig.8) mostra claramente a distinção entre as superfícies resultantes dos três métodos de tratamento. O titânio polido apresenta superfície plana com evidências de direcionamento de sulcos e cristas decorrentes do lixamento e polimento (fig. 8-c). A amostra submetida ao plasma de nitrogênio em configuração de gaiola catódica mostra picos e vales com pouco espaçamento distribuídos homoganeamente por toda a superfície (fig. 8-a). Observa-se que a média da distância vertical máxima entre os picos mais altos e os vales mais baixos, expressos pelo parâmetro R_y , são mais destacados nessa condição de tratamento, o que denota uma superfície com perfil agudo. A configuração planar produz igualmente uma superfície rugosa, no entanto, os picos e vales se distanciam menos em relação ao perfil médio da superfície (fig 8-b).

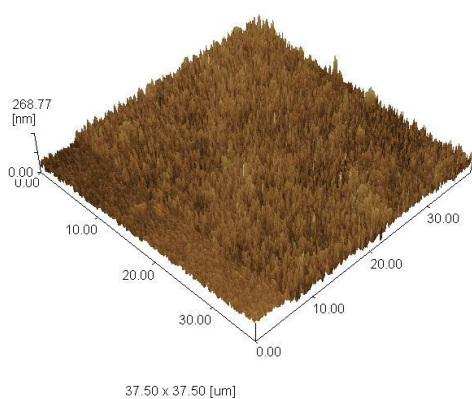


Figura a. gaiola catódica

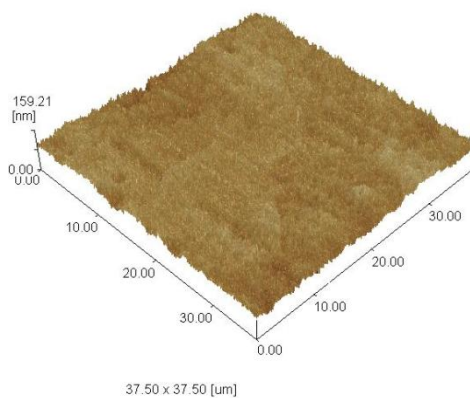


Figura b. planar

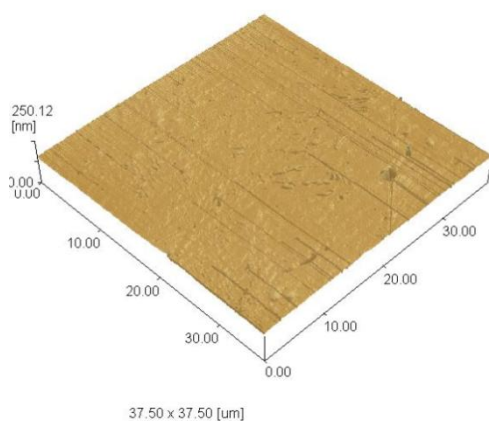


Figura c. polida

Figura 8 – Topografia tridimensional dos diferentes tipos de tratamento por microscopia de força atômica (MFA)

5.3 RUGOSIDADE

As medidas de rugosidade foram obtidas por dois métodos distintos; perfilômetro de contato e microscopia de força atômica. As medidas de rugosidade por microscopia de força atômica foram feitas considerando-se quatro direções diferentes da amostra, variando-se os ângulos de medida em 45° em uma mesma amostra. Os valores de rugosidade representam a média das quatro medidas. Esses dados estão expressos na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de rugosidade obtidos por microscopia de força atômica (MFA)

		Parâmetros de rugosidade em nanômetros					
tratamento	amostra	Ra	Ry	Rz	Rms	Rp	Rv
Polido	1	6.6	216.2	85.6	8.3	183.9	32.3
Polido	2	8.5	321.3	106.0	10.7	298.3	23.0
Polido	3	2.4	216.0	77.3	3.8	153.7	62.0
Planar	1	10.4	261.9	108.3	15.1	157.6	104.3
Planar	2	11.1	110.9	51.7	1.9	54.2	57.0
Planar	3	13.0	293.7	120.7	16.7	227.7	66.0
Gaiola	1	24.6	385.1	141.4	30.7	277.0	108.0
Gaiola	2	22.6	414.2	189.0	30.0	316.2	96.0
Gaiola	3	25.2	711.2	307.5	34.4	593.8	117.3

As medidas de rugosidade por profilômetro mecânico foram feitas considerando-se três direções diferentes da amostra, variando-se os ângulos de medida em 45° em uma mesma amostra. Os valores de rugosidade representam a média das medidas. Esses dados estão expressos na tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de rugosidade obtidos por profilômetro mecânico

		Parâmetros de rugosidade em micrometros					
Tratamento	amostra	Ra	Rq	Rz	Rms	Rp	Rv
Polido	1	0.04	0.05	0.24	0.05	0.14	0.11
Polido	2	0.04	0.05	0.22	0.05	0.11	0.11
Polido	3	0.04	0.05	0.26	0.06	0.12	0.14
Polido	4	0.04	0.05	0.25	0.06	0.12	0.12
Polido	5	0.04	0.05	0.24	0.06	0.11	0.12
Polido	6	0.04	0.05	0.25	0.06	0.14	0.11
Planar	1	0.30	0.37	1.48	0.37	0.67	0.81
Planar	2	0.04	0.06	0.24	0.06	0.11	0.12

Planar	3	0.06	0.08	0.36	0.08	0.16	0.20
Planar	4	0.06	0.08	0.37	0.08	0.21	0.15
Planar	5	0.07	0.09	0.40	0.09	0.20	0.20
Planar	6	0.07	0.09	0.41	0.09	0.18	0.23
Gaiol	1	0.04	0.05	0.23	0.05	0.12	0.11
Gaiol	2	0.11	0.13	0.62	0.13	0.30	0.32
Gaiol	3	0.09	0.11	0.39	0.11	0.20	0.18
Gaiol	4	0.07	0.09	0.39	0.09	0.19	0.19
Gaiol	5	0.13	0.15	0.66	0.15	0.30	0.30
Gaiol	6	0.08	0.10	0.46	0.10	0.23	0.23

As amostras tratadas na gaiola catódica apresentam valores de rugosidade significativamente diferentes dos outros grupos, sugerindo um efeito positivo dessa configuração em alterar a textura do titânio, dado evidenciado no perfil obtido pela microscopia de força atômica.

Tabela 5 - nº de amostras, medianas, quartil 25, média dos postos e significância estatística para valores de rugosidade (R_a) referentes aos diferentes tratamentos do titânio obtidos por microscopia de força atômica

	n	Mediana	Q25	Média dos postos	P
Polido^a	3	6,6	2,4	2	0,027
Planar^b	3	11,1	10,4	5	-
Gaiola^c	3	24,6	22,6	8	-

Letras iguais revelam não existir diferença significativa
Nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Os parâmetros de rugosidade também foram mensurados por profilômetro mecânico. As medidas foram tomadas em seis amostras de cada grupo experimental sob três direções diferentes, em ângulos de aproximadamente 120° com dispersão nestas três direções inferior a 10%. (Tabela 6).

Tabela 6 - n° de amostras, medianas, quartil 25 e 75, média dos postos e significância estatística para valores de rugosidade (R_a) referentes aos diferentes tratamentos do titânio obtidos por perfilômetro mecânico

	n	Mediana	Q25- Q75	Média dos postos	P
Polido^a	6	0,04	0,04- 0,04	4,5	0,01
Planar^b	6	0,06	0,05- 0,12	10,92	-
Gaiola^b	6	0,08	0,06- 0,11	13,8	-

Letras iguais revelam não existir diferença significativa
Nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Os valores de rugosidade obtidos foram significativamente diferentes entre as amostras polidas e as amostras expostas ao plasma. Não houve diferença significativa entre as duas configurações de nitretação.

Ambos os métodos de avaliação de rugosidade foram capazes de identificar diferenças de rugosidade de superfície entre os grupos experimentais (figs. 9 e 10).

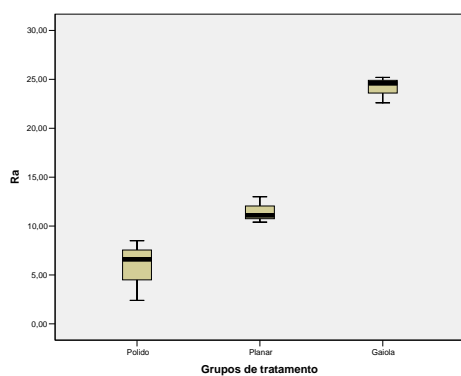


Figura 9 - Valores de rugosidade média (R_a) obtidos por microscopia de força atômica

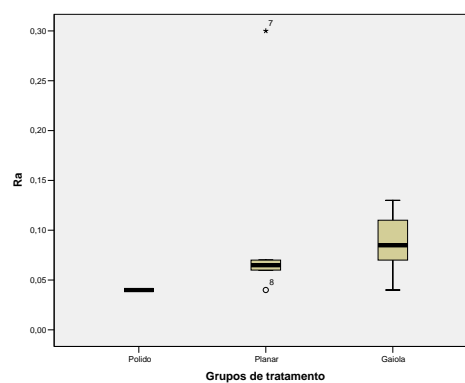


Figura 10 - Valores de rugosidade média (R_a) obtidos por perfilômetro mecânico.

5.4 MOLHABILIDADE

A molhabilidade foi obtida de três amostras de cada grupo experimental pela determinação do ângulo de contato estático para cada uma das amostras e mensurada por dois observadores (fig 11).



Figura 11 - Ângulo de contato nas diferentes superfícies do titânio

Os dados demonstram que a superfície com maiores valores de rugosidade ($R_a = 24\text{nm}$) apresenta menores ângulos de contato do líquido com o titânio, caracterizando um comportamento hidrofílico e polar dessa nova superfície obtida em configuração de gaiola catódica.

Tabela 7 - n° de amostras, medianas, quartil 25, média dos postos e significância estatística para os valores dos ângulos de contato referentes aos diferentes tratamentos do titânio

	n	Mediana	Q25	Média dos postos	P
Polido ^a	3	15,29	14,52	5	0,027
Planar ^b	3	49,20	48,70	8	-
Gaiola ^c	3	11,70	9,85	2	-

Letras iguais revelam não existir diferença significativa
Nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

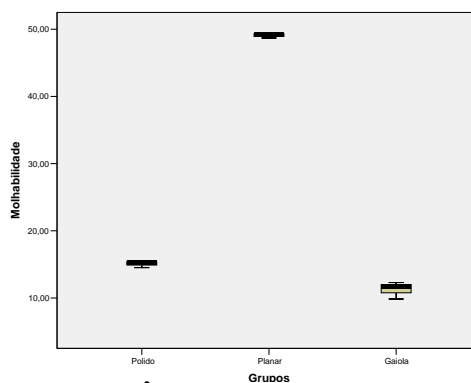


Figura 12 - Ângulo de contato nas diferentes superfícies de titânio

5.5 ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células MC3T3 reagiram de modo particular tanto à topografia quanto a composição química das superfícies expostas. A adesão celular foi mais pronunciada no controle. O plástico representa tanto uma superfície mais lisa, como é quimicamente diferente do titânio, além de ser o ambiente padrão para o cultivo celular. Há diferença significativa para os valores de adesão celular em 24 horas para as superfícies de titânio (tabela 8).

Tabela 8 - n° de amostras, medianas, quartil 25 e 75, média dos postos e significância estatística para valores de adesão celular em 24 horas referentes aos diferentes tratamentos do titânio

	n	Mediana	Q25- Q75	Média dos postos	P
Plástico^a	4	18,2x10 ⁴	11,8x10 ⁴ – 21,9x10 ⁴	11,5	0,013
Polido^b	3	4x10 ⁴	2,8x10 ⁴ - .	2,0	-
Planar^c	3	5,6x10 ⁴	5,2x10 ⁴ - .	5,5	-
Gaiola^c	3	6,8x10 ⁴	5,6x10 ⁴ - .	7,5	-

Letras iguais revelam não existir diferença significativa
Nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

A proliferação celular apresentou um comportamento semelhante em relação ao controle, embora não tenha havido diferenças estatísticas significativas entre as superfícies polida e nitretada, nestas, independente da configuração de tratamento (tabela 9).

Tabela 9 - n° de amostras, medianas, quartil 25 e 75, média dos postos e significância estatística para valores de proliferação celular em 72 horas referentes aos diferentes tratamentos do titânio

	n	Mediana	Q25- Q75	Média dos postos	P
Plástico^a	4	67,2x10 ⁴	49,2x10 ⁴ – 89,7x10 ⁴	11,5	0,036
Polido^b	3	18,8x10 ⁴	12,0x10 ⁴ - .	4,3	-
Planar^b	3	21,6x10 ⁴	21,2x10 ⁴ - .	6,6	-
Gaiola^b	3	15,6x10 ⁴	12,8x10 ⁴ - .	4,0	-

Letras iguais revelam não existir diferença significativa
Nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Entre as diferentes superfícies do titânio a adesão foi mais pronunciada na superfície obtida por meio da configuração de plasma em gaiola catódica, indicando que a microarquitetura favorece a acomodação celular (Figuras 13-15).

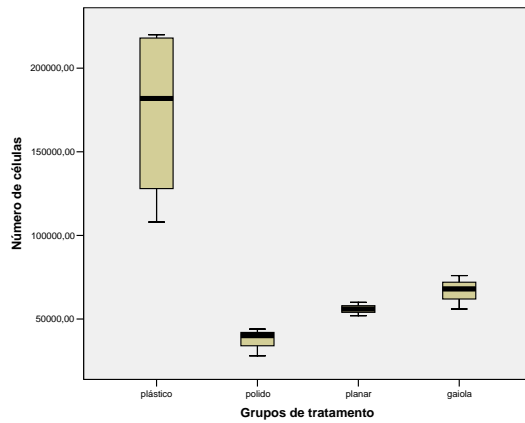


Figura 13 - Adesão de osteoblastos MC3T3 em 24 horas nos diferentes grupos

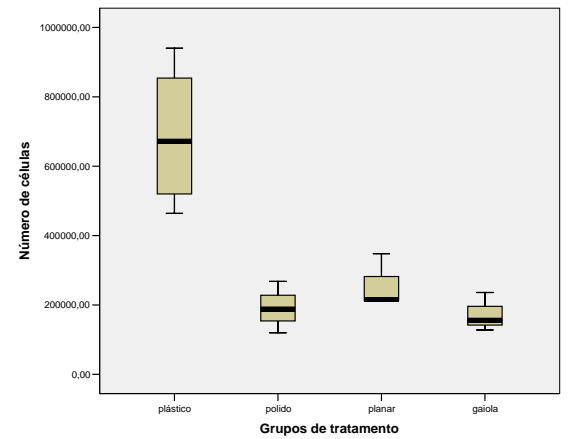
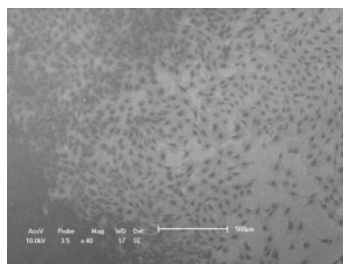
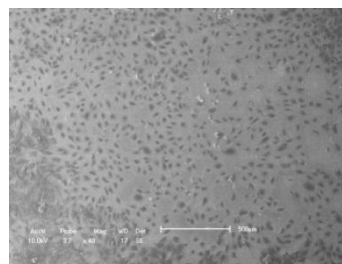


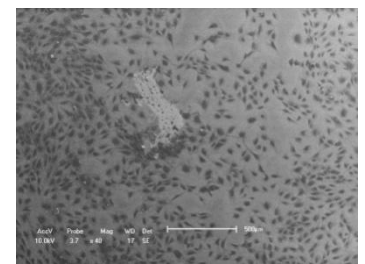
Figura 14 - Proliferação de osteoblastos MC3T3 em 72 horas nos diferentes grupos



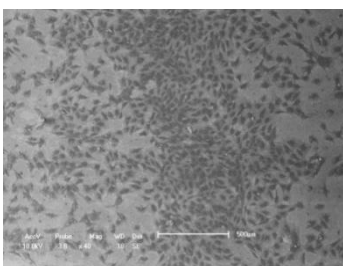
Polida(a)



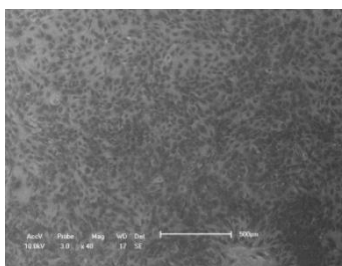
Polida(b)



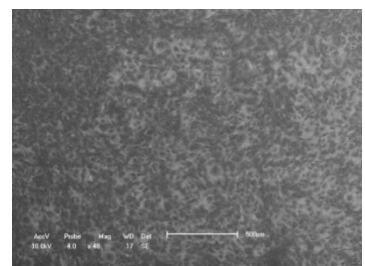
Polida(c)



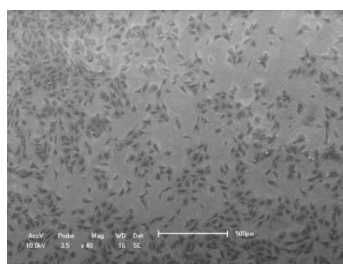
Planar(a)



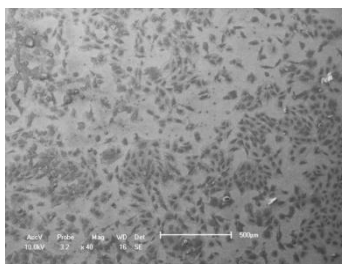
Planar(b)



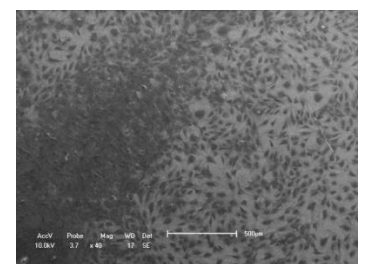
Planar(c)



Gaiola catódica (a)



Gaiola catódica (b)



Gaiola catódica(c)

Figura 15 – Adesão e proliferação de osteoblastos MC3T3 nas diferentes superfícies de titânio em 24,48 e 72 horas (a,b e c respectivamente) visualizadas por MEV

5.6 CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular aumentou de modo linear no grupo controle nos períodos de avaliação. As células proliferaram de modo expressivo em 48 horas, com discreta diferença dentro do grupo planar de 24 para 48 horas (figura 16). Os resultados indicam que a adesão sofre mais impacto das características superficiais do titânio, pois à medida que as células tendem a confluência, as camadas sobrepostas já tem pouco contato com a topografia original.

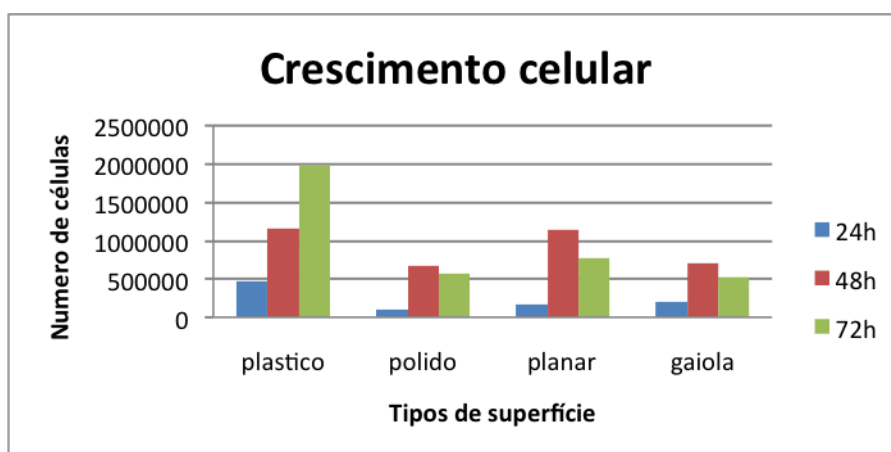
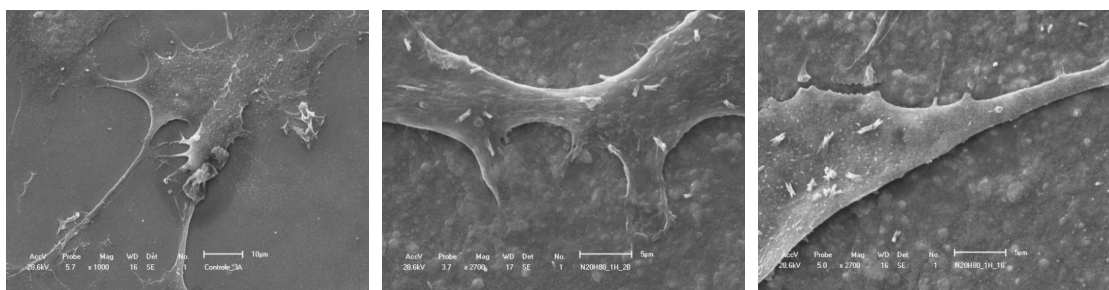


Figura 16 - Proliferação celular nos diferentes grupos identificados por MEV

5.7 MORFOLOGIA CELULAR

A morfologia dos osteoblastos variou de acordo com o padrão da superfície do titânio. Nas amostras polidas com baixos valores de R_a , a

célula adquiriu a forma achatada com regiões de contato entre as células e aparentemente não seguindo um padrão de orientação paralelo às linhas de orientação causadas pelo lixamento (fig. 17a). Nas superfícies rugosas, observam-se projeções dendríticas, distribuídas aleatoriamente pela superfície. Verifica-se discretos filopódios, representando pontos de adesão focal em resposta a rugosidade superficial e as células apresentando maior proximidade umas com as outras (figs. 17b e 17c)



a.Polida

b.Planar

c.Gaiola catódica

Figura 17 - Morfologia dos osteoblastos em 24h nas diferentes superfícies

6 DISCUSSÃO

Desde a introdução de materiais metálicos como substitutos de articulações em humanos, busca-se incessantemente o aprimoramento destes de modo a obter articulações artificiais biocompatíveis e funcionalmente estáveis. A larga aplicação do titânio como biomaterial deve-se em grande parte a sua excelente adaptação ao tecido orgânico, notadamente ao tecido ósseo.

Há décadas os implantes de titânio com superfícies lisas têm sido utilizados com finalidades diversas em odontologia e medicina, tais como materiais de osteossíntese, implantes dentários, próteses ortopédicas e *stents* vasculares. Com a evolução do tratamento clínico e apoiado em estudos experimentais houve uma transição para o desenvolvimento de implantes com área de superfície aumentada ou mesmo modificada quimicamente.

Essas superfícies são responsáveis por assegurar uma melhor estabilidade óssea inicial propiciando uma osseointegração mais rápida e a aplicação precoce de carga mecânica sobre esses implantes, além de assegurar estabilidade em longo prazo, que é o objetivo primordial de qualquer material para uso protético.

Diversos métodos de tratamento de superfície têm sido desenvolvidos desde a introdução do conceito da osseointegração na década de 60. Dentre as modalidades encontram-se processos com aplicação na confecção de

implantes em escala industrial para criar superfícies texturizadas através de revestimento por PVD e CVD, jateamento com partículas abrasivas, ataque com substâncias ácidas, tratamento termoquímico, laser, implantação iônica e o uso de plasma em configurações variadas (Aronson et al. 1997; Sykaras, 2000; Cheung, 2002; Ikeda et al. 2002; Kasemo, 2002; Mändl; Rauschenbach, 2002; Mändl et al., 2002; Le Guéhennec et al., 2007). Cada método apresenta particularidades no modo como altera o material, seja por adição ou subtração de componentes da superfície ou de camadas mais profundas do material.

Vários estudos concentram-se em examinar o efeito de métodos específicos de tratamento de superfície na composição e estrutura da camada de óxido para os materiais a base de titânio. O resultado dos diferentes tratamentos origina superfícies com alterações topográficas de diferentes dimensões espaciais representadas, em sua maioria, pela rugosidade superficial, mas também na composição química e na energia livre da superfície de modo que essas alterações podem ser caracterizadas por parâmetros físicos e químicos (Kilpadi, Lemons, 1994; Czarnowska et al., 1999; Mekayarajjanonh, 1999; Placko et al., 2000; Wennerberg, Albrektson, 2000; Lim et al., 2001; Amaral et al. 2002; Lakshmi et al., 2002; Rupp et al., 2004; Kholes et al., 2004; Vanzillota et al., 2004; Czyrska-Filemonowicz et al., 2005; Nowakowski 2006).

Avaliou-se neste trabalho o efeito da modificação de superfícies de titânio puro grau II pela nitretação em plasma por descarga luminescente. A técnica consiste em expor o titânio em uma atmosfera gasosa contendo uma

mistura de N_2 e H_2 com fluxo de 15sccm na proporção 20-80% respectivamente, a baixa pressão, ionizados por corrente contínua da ordem de 600V, mantendo-se a temperatura de tratamento controlada de 450 °C, durante 60 minutos. Este método de tratamento foi introduzido na modificação de materiais para implantes dentais e consiste na deposição de nitretos em superfícies metálicas quando inseridas em plasma de nitrogênio. Apresenta características peculiares como ser ambientalmente limpa, permite o tratamento a baixa temperatura, melhor controle da espessura da camada, tempo de tratamento curto, uniformidade na espessura da camada, nitretação de partes da peça, e é econômica em relação a técnicas mais convencionais (Ahmed, 1987; Alves Jr, 1995; Alves Jr, 2001).

No presente trabalho, a nitretação das amostras foi realizada na configuração planar, onde os discos eram apoiados no porta-amostra e na configuração em gaiola catódica, onde as amostras foram circundadas por uma gaiola de titânio com o objetivo de potencializar o efeito do plasma.

As amostras submetidas às diferentes condições do plasma comportam-se de modo a produzir camadas superficiais com distintas características analisadas ao difratômetro de Raio X. Nas amostras nitretadas, os picos referentes a fase α -titânio possuem intensidade inferior aos das amostras não nitretadas. Uma vez que o substrato das duas amostras é semelhante, a explicação para essa diminuição está na absorção dessa radiação pela fase superficial formada devido ao tratamento. Também se observa que, de um modo geral, há um deslocamento para a esquerda desses picos quando comparados àqueles das amostras não tratadas.

Sabe-se que pela lei de Bragg a posição angular é inversamente proporcional à distância interplanar. Deste modo, houve aumento na distância interplanar na fase α provocada provavelmente pela inserção dos átomos de nitrogênio na rede do titânio, formando uma solução sólida contínua.

Outro aspecto a ser considerado foi o ângulo de varredura utilizado. Duas amostras foram analisadas com ângulos de varredura entre 30 e 80°. Provavelmente o ângulo de varredura utilizado tenha identificado o rearranjo na estrutura cristalográfica do titânio ocasionado pelo processamento a plasma. Ângulos rasantes podem identificar melhor as fases que se formam na camada superficial e não na estrutura interna da amostra. A utilização de ângulos de varredura da ordem de 4° podem detectar com mais precisão a fase TiN, Ti₂N em amostras nitretadas a plasma (Lakshmi et al. 2002). O exame por MEV destaca a formação de compostos de precipitados na superfície das amostras nitretadas não identificados pela difração de raios X.

O tempo de exposição do titânio na atmosfera do plasma parece influenciar a formação de compostos de nitreto de titânio na superfície do material, tendo em vista o aparecimento de fases de TiN nas amostras nitretadas no tempo de 2 horas e a ausência deste composto em tempos mais curtos de exposição. A formação de TiN em atmosferas no tempo de 2 horas mostra maior incorporação de N₂ numa concentração menor do gás. Essa diferença pode ser atribuída à maior concentração de H₂ na atmosfera, o que induz maior passivação da superfície e permite maior incorporação do

nitrogênio no titânio, haja vista que o composto TiN reflete uma fase mais rica em nitrogênio (Guerra Neto, 2001).

A alteração na concentração do gás também induz alterações nas camadas superficiais do titânio tempo dependente. Amostras nitretadas com 80% de nitrogênio em 1 hora de exposição ao plasma revelaram a menor interação entre o titânio superficial e o nitrogênio do plasma. Amostras submetidas à atmosfera do plasma contendo N₂ a 80% e uma hora de exposição não foram capazes de formar compostos de nitreto de titânio, provavelmente devido a pouca passivação da superfície, em consequência da baixa concentração de H₂ no plasma associado ao menor tempo de tratamento superficial (Alves Jr., 2006).

Os resultados sugerem que as condições utilizadas na investigação representam o nível ideal de concentração de H₂ em função do tempo, com a finalidade de obtenção de nitretos em superfícies de titânio num curto espaço de tempo, ou pelo menos, no menor tempo possível com a utilização desta técnica. Embora ambos os parâmetros influenciem na formação de uma superfície quimicamente modificada, os compostos de TiN, mais ricos em nitrogênio, dependem mais do tempo de exposição do que da concentração de H₂ (Guerra Neto, 2001).

Ligas de titânio polidas com alumina submetidas a nitretação a plasma apresentam fases de TiN dependentes da mistura do gás e do tempo de exposição. A dureza da camada é maior quando tratada em temperatura de 900 °C por quatro horas contendo mistura de nitrogênio e hidrogênio, além de apresentar aumento na resistência a corrosão (Lakshmi et al.,

2002). Este fato atesta favoravelmente ao uso da nitretação a plasma, pois a redução da corrosão é um requisito fundamental para a biocompatibilidade do titânio.

A caracterização de superfície revelou alterações topográficas significativas provocadas pela nitretação a plasma em ambas as configurações. Os três grupos apresentaram texturas de superfície distintas, embora o tratamento por gaiola catódica tenha criado micro-granulações uniformemente distribuídas pelo disco. Enquanto as amostras tratadas no plasma de nitrogênio evidenciam a formação de superfície texturizada com variações de amplitude em toda a superfície do material, o titânio polido não, tendo como consequência, valores distintos nos parâmetros de rugosidade em escala nanométrica, conforme achados na microscopia por força atômica.

Discos de titânio lixados com carbetto de silicone, eletropolidos e jateados com partículas de fosfato de cálcio revelam morfologia distinta quando analisados por MEV e MFA. Apenas fases de titânio são identificadas, o que indica que a topografia foi alterada em consequência do tipo de tratamento, sem modificar a composição química independente da composição do substrato. Um fato relevante é que os valores da rugosidade dependem da escala de avaliação. Quando analisadas em escalas acima de 100 μ m, tanto as amostras jateadas quanto as eletropolidas são idênticas. Em escalas menores, abaixo de 1 μ m, as amostras eletropolidas e polidas aparecem idênticas. Portanto, os valores quantitativos da rugosidade dependem significativamente do nível de resolução da medida (Placko et al.,

2000). De modo similar, a mensuração de valores de R_a por profilômetro de contato, microscopia de força atômica e interferômetro realizadas em discos preparados com métodos típicos da confecção de implantes dentais, revelam que o tratamento de superfície e o tipo de instrumento influenciam fortemente os valores de R_a (Kholes et al., 2004).

A topografia analisada por MFA mostra claramente a distinção entre as superfícies resultantes dos três métodos de tratamento. O titânio polido apresenta superfície plana com evidências de direcionamento de sulcos e cristas decorrentes do lixamento e polimento. A amostra submetida ao plasma de nitrogênio em configuração de gaiola catódica mostra picos e vales com pouco espaçamento distribuídos homoganeamente por toda a superfície. Observa-se que a média da distância vertical máxima entre os picos mais altos e os vales mais baixos, expressos pelo parâmetro R_y , são mais destacados nessa condição de tratamento, o que denota uma superfície com perfil agudo. A configuração planar produz igualmente uma superfície rugosa, no entanto os picos e vales distanciam-se menos em relação ao perfil médio da superfície.

As amostras tratadas na gaiola catódica apresentam valores de rugosidade significativamente diferentes dos outros grupos, sugerindo um efeito positivo dessa configuração em alterar a textura do titânio, dado evidenciado no perfil obtido pela microscopia de força atômica. Neste caso em particular, apenas amostras de titânio puro grau II foram utilizadas e, portanto, não foi possível determinar o efeito da nitretação em diferentes composições do titânio.

A análise da rugosidade foi obtida primeiramente pelo profilômetro de contato. Esse método, apesar de utilizado largamente em estudos de caracterização de superfícies, apresenta limitações quanto ao nível de resolução da escala (μm). Ainda assim, os valores de rugosidade obtidos foram significativamente diferentes entre as amostras polidas e as amostras expostas ao plasma. Não houve diferença significativa entre as duas configurações de nitretação. Estes dados são coerentes com os valores obtidos pela MFA, o que valida, de certo modo, a mensuração da rugosidade superficial de amostras de titânio com dispositivos tradicionais, levando em consideração que a variabilidade nos métodos de caracterização da rugosidade pode obscurecer as correlações funcionais entre a topografia de superfície e os eventos iniciais da osseointegração.

Os protocolos para quantificar os valores de rugosidade são variados assim como os métodos de mensuração. É importante que se estabeleça um padrão nos estudos de caracterização levando em consideração esses detalhes, assim como o número de medidas mínimas necessárias para obter inferência estatísticas. Embora não haja consenso na literatura consultada, há predileção por no mínimo três medidas em cada amostra e três amostras de cada tipo diferente de topografia (Sykaras et al., 2000; Bagno et al., 2004, Kholes et al., 2004).

A molhabilidade foi obtida de cinco amostras de cada grupo experimental pela determinação do ângulo de contato estático ou técnica da gota séssil para cada uma das amostras e mensurada por dois observadores. Os dados demonstram que a superfície com maiores valores

de rugosidade ($R_a = 24\text{nm}$) apresenta menores ângulos de contato do líquido com o titânio, caracterizando um comportamento hidrofílico e polar dessa nova superfície obtida em configuração de gaiola catódica. Este fato pode ser relacionado a uma superfície rugosa com um padrão de perfil regular, reduzindo a possibilidade de que contaminantes possam ficar retidos em microdeformações ao longo da superfície.

Durante a fase de tratamento o reator foi alimentado com o fluxo de H_2 durante aproximadamente 30 minutos e até que a temperatura atingisse $450\text{ }^\circ\text{C}$ mantendo a baixa pressão. A adição de Hidrogênio (H_2) ao plasma tem por objetivo a passivação e ativação da superfície pela remoção da camada de óxido e limpeza de impurezas que podem estar presentes na superfície da amostra e interferir no processo de nitretação.

A redução da molhabilidade também é atribuída ao acúmulo de elétrons quando se utiliza o plasma de argônio em configuração anódica e não ao efeito apenas da limpeza promovido por íons positivos e nêutrons gerados pela configuração catódica (Shibata, 2002). Nestas condições, osteoclastos apresentam maior diferenciação e as proteínas presentes no meio de cultura, relacionadas ao fenômeno de adesão celular, são mais adsorvidas do que no titânio polido (Kaway et al., 2004). Considerando que a adsorção de proteínas séricas na superfície do material é um evento primário na osseointegração, a adesão celular mediada pela fibronectina e outras proteínas é aumentada em superfícies tratadas a plasma.

Muito embora as condições estabelecidas no presente trabalho difiram do plasma de argônio, é possível que a redução do componente

hidrofóbico seja uma combinação de fatores que alterem a polaridade e a energia de superfície.

Em geral, as superfícies hidrofílicas representam melhores condições para a adesão celular do que superfícies hidrofóbicas. Os estudos de caracterização de superfície atribuem a molhabilidade um papel relevante no modo como osteoblastos aderem e proliferam no titânio (Lampin et al., 1997; Ponsonnet et al. 2003)

Apesar da dificuldade em atribuir a este dado isolado o efeito na molhabilidade, observa-se uma relação próxima entre a rugosidade e a molhabilidade do titânio, que é dependente do tipo de tratamento utilizado na obtenção de novas superfícies. No presente trabalho as superfícies tratadas em gaiola apresentaram redução no ângulo de contato ao líquido utilizado, confirmando uma superfície com melhor molhabilidade, a qual refletiu melhor adesão celular. A nitretação a plasma mostrou-se uma técnica eficaz na modificação de superfície do titânio tanto no aumento da rugosidade quanto no aumento da molhabilidade.

Alguns parâmetros devem ser observados quando se avalia a molhabilidade superficial de um biomaterial. Fatores como a composição química do material, estrutura cristalográfica, líquidos usados nas medições e tipo de tratamento, todos influenciam no resultado obtido.

Os modelos *in vitro* são propostos com o intuito de melhor compreender os fenômenos iniciais do processo de osseointegração e de como as células interagem com superfícies modificadas pelos mais variados métodos. A adesão funcional e estrutural entre o tecido ósseo e a superfície

de implantes ortopédicos submetidos à carga sugere ser fator de sucesso *in vivo* (Sinha et al., 1994).

A superfície modificada deve conservar as propriedades intrínsecas do material e ser biocompatível, pois o objetivo final de qualquer alteração superficial é exercer algum grau de controle sobre os processos que o organismo ou biomoléculas respondem ao material, que podem variar de uma reação de citotoxicidade até a indução de osseointegração entre o material e o osso do organismo receptor (Brunete, 1988; Kasemo et al., 1998).

É sabido que a adesão celular na superfície do titânio é um fator primordial para a osseointegração de próteses metálicas e implantes dentais. Têm sido dada muita ênfase ao papel da rugosidade superficial do titânio como o principal responsável pela adesão de osteoblastos e a conseqüente formação de tecido mineralizado na interface com o implante (Martin et al., 1995; Ong, 1996; Castellani, 1999; Lavos-Valereto et al., 2002; Schimidt et al., 2002; Nebe et al., 2004; Huang et al., 2004) embora trabalhos demonstrem que superfícies com diferentes rugosidades respondam de maneira semelhante no que diz respeito a adesão e proliferação celular (Mustafa et al., 2001; Rosa, Beloti, 2003; Xavier et al., 2003; Anselme, Bigerele 2006)

A rugosidade média de uma superfície (R_a) isoladamente não é um parâmetro definitivo para se avaliar o comportamento de uma célula à textura do material. Diferentes métodos de tratamento podem produzir valores de R_a semelhantes e não refletir o impacto do método no

desempenho clínico. A análise de parâmetros híbridos da topografia merece ser mais bem investigada na caracterização e eventual correlação com a molhabilidade e com a alteração na morfologia celular durante a fase de adesão.

Devido a limitação de testar a biocompatibilidade de materiais *in vivo*, os modelos *in vitro* com culturas de células são os mais freqüentemente utilizados para avaliar as etapas iniciais de osseointegração em biomateriais. Esses modelos criam microambientes bem controlados, acessíveis e fornecem dados consistentes para análise (Schmalz, 1994; Hanks et al., 1996; Cooper et al., 1998; Li, 1999; Brunette, 1999).

Os ensaios de biocompatibilidade em novas superfícies de titânio são realizados com diferentes tipos de células (primárias, clones, imortalizadas) que guardam propriedades específicas quanto ao grau de interação com o microambiente do material. As células osteoblásticas permitem estudar as interações célula/material essenciais no desenvolvimento de novos materiais. Muitos trabalhos são realizados com linhagens de células imortalizadas com o potencial de expressar características fenotípicas dos osteoblastos como SaoS2, MG-63, L929, ROS17/2.8, MC3T3 (Jayamaran, 2004; Faghihi et al., 2006; Abdizina et al., 2007).

A escolha pelo tipo celular adotado no estudo foi baseada no fato de as células MC3T3 serem consideradas uma linhagem pré-osteoblástica (osteoblast-like) obtida a partir da calvária de ratos com potencial de diferenciação. Estudos de diferenciação demonstram a capacidade das MC3T3 em expressar fosfatase alcalina e sintetizar matriz extracelular

contendo osteocalcina, osteopontina, osteonectina e colágeno tipo I, tornando-as viáveis para estudos de biocompatibilidade de novos materiais (Cooper et al., 1998; Eisenbarth, 2002; Linez-Bataillon et al., 2002).

A resposta celular na interface é influenciada pelas condições de superfície, tais como tipo e pureza do material, rugosidade, molhabilidade e energia de superfície. A atenção tem se voltado para a energia de superfície e para a molhabilidade como parâmetros importantes na resposta celular, embora a rugosidade também atue diretamente (Lampin et al., 1997; Placko et al., 2000; Shibata et al., 2002; Ponsonnet et al., 2003).

As células MC3T3 reagiram de modo particular tanto à topografia quanto a composição química das superfícies expostas. A adesão celular foi mais pronunciada no controle. O plástico representa tanto uma superfície mais lisa como é quimicamente diferente do titânio, além de ser o ambiente padrão para o cultivo celular. Esse comportamento é observado freqüentemente em estudos de biocompatibilidade de superfícies (Lincks et al., 1998; Anselme et al., 2000; Linez-Bataillon et al., 2002).

Entre as diferentes superfícies do titânio a adesão foi mais pronunciada na superfície com maior rugosidade, indicando que a microarquitetura favorece a acomodação da celular. Os discos tratados na configuração de gaiola catódica apresentaram superfície mais rugosa do que na configuração planar e mais células aderidas em 24 horas. Os resultados sugerem um efeito positivo da gaiola na capacidade de gerar superfícies texturizadas homogêneas, pela concentração de íons energizados próximos às amostras, uma vez que as condições de temperatura, pressão do reator e

tempo de tratamento foram idênticos em ambas as configurações. Ainda, as amostras nitretadas em gaiola catódica, podem ter a superfície com mais compostos de TiN devido a alta densidade de íons concentrada sobre as amostras, de modo que a célula interage com uma superfície nos aspectos topográficos e químicos.

A adesão celular parece ser favorecida em superfícies rugosas em comparação a polidas (Lampin et al., 1996; Martin et al., 1996; Bächle, Kohal, 2004) embora sem preferência quanto ao Tlcp e liga de Ti Al₆V₄ (Placko et al., 2000). No presente trabalho todas as amostras foram obtidas do titânio puro grau II e nenhuma consideração pode ser feita quanto a nitretação alterar de modo diferente o titânio puro e suas ligas. O estudo de diferentes métodos de preparo de superfície do titânio e aço inoxidável revela que nem a amplitude da rugosidade nem a composição do material influenciam a adesão celular, exceto em substratos de titânio puro tratados com jateamento de areia. Entretanto, atribui-se alta significância entre os diferentes processos de preparo e a morfologia e composição química da camada superficial resultante de cada método (Anselme, Bigerelle, 2006; Faghihi et al., 2006). De outro modo, estudos com células MG-63, derivadas de fibroblasto humano, demonstram que o aumento na rugosidade do titânio diminui a proliferação e aumenta a diferenciação celular (Wirth et al., 2008).

Aparentemente existe uma relação entre a rugosidade superficial e a adesão celular onde os osteoblastos aderem mais em superfícies mais rugosas até um determinado limite. Portanto, o desenvolvimento de novas superfícies, independente do método, é conduzido com alterações nos

parâmetros da técnica (plasma, ataque ácido, jateamento) com o objetivo de estabelecer a melhor condição de topografia que possa induzir uma resposta biológica mais favorável (Mustafa et al., 2000).

A proliferação celular apresentou um comportamento semelhante em relação ao controle, embora não tenha havido diferenças estatísticas significativas entre as superfícies polida e nitretada, nestas, independente da configuração de tratamento. Este achado é um indicador da não toxicidade do filme de nitreto de titânio .

O crescimento celular aumentou de modo linear no grupo controle nos períodos de avaliação. As células proliferaram de modo expressivo em 48 horas com discreta diferença dentro do grupo planar de 24 para 48 horas. Os resultados indicam que a adesão sofre mais impacto das características superficiais do titânio, pois a medida que as células tendem a confluência, as camadas sobrepostas já têm pouco contato com a topografia original. Embora não tenha havido seguimento das células por um maior período de tempo, a redução no número de células pode corresponder ao início do processo de diferenciação celular, onde há redução na atividade proliferativa e o início da produção de matriz extracelular.

A morfologia dos osteoblastos variou de acordo com o padrão da superfície do titânio. Nas amostras polidas com baixos valores de R_a a célula adquiriu a forma achatada, aparentemente seguindo uma orientação paralela às linhas de orientação causadas pelo lixamento e mantendo poucas regiões de contato entre as células. Nas superfícies rugosas, observa-se projeções dendríticas, distribuídas aleatoriamente pela superfície

e discretos filopódios, representando pontos de adesão focal em resposta a rugosidade superficial, embora não tenha sido possível identificar claramente diferenças na morfologia da celular entre as diferentes superfícies.

O titânio possui estruturas policristalinas com diferentes orientações que são identificadas por difração de raios X. As propriedades físicas desse material dependem da distribuição e orientação dos cristais. Células pré-osteoblásticas MC3T3 expostas a amostras de $Ti AL_6 V_4$ com duas orientações cristalográficas sugerem que a adesão e a proliferação celular sofrem efeito da orientação tridimensional dos cristais e que o tipo de processamento é determinante dessa modificação (Faghihi et al., 2006).

Muitos estudos são direcionados para definir a natureza das interações entre a característica da camada do $Ti_{2}O_3$ e os tecidos circunvizinhos e os efeitos biológicos do tratamento de superfície. Apesar do potencial de se controlar propriedades específicas, as características desejáveis não são completamente definidas ou compreendidas. A combinação dos efeitos da textura e da composição química deve ser levada em consideração.

Os modelos adotados para o estudo do comportamento da célula em relação a uma nova superfície do titânio apresentam grande variação nos desenhos experimentais, incluindo o método de preparo da amostra, esterilização e tipo celular, gerando controvérsias sobre o real papel que cada fator desempenha nos resultados. Portanto, é imprescindível que os resultados sejam analisados considerando que diferentes métodos de

preparo podem gerar superfícies com potencial de induzir respostas distintas na reação celular.

No presente trabalho foi possível observar dificuldades com o controle do equipamento de nitretação. Pequenas alterações no fluxo de gás e da pressão interna do reator podem alterar as características de superfície das amostras submetidas ao plasma. Portanto pode-se afirmar que o controle rígido de todo o processo é importante para se obter amostras com homogeneidade e confiabilidade dos resultados.

O tempo de execução do processo pode ser considerado um ponto crítico do ponto de vista experimental, uma vez que a temperatura de trabalho é obtida após cerca de 45 minutos de iniciado o sistema e as amostras só podem ser retiradas após o resfriamento do reator, elevando assim o tempo total de cada ciclo de nitretação em aproximadamente três horas. O tamanho do porta-amostra também é um fator limitante na quantidade de discos que podem ser expostos ao plasma por unidade de tempo. Essas limitações devem ser superadas em trabalhos futuros e no desenvolvimento de equipamentos de nitretação em escala industrial.

No caso da nitretação a plasma, os resultados obtidos confirmam a viabilidade do uso da técnica e seu efeito positivo nos eventos celulares iniciais do processo de osseointegração. Este método é capaz de produzir modificações topográficas e na composição química da camada superficial, mantendo as características de biocompatibilidade dessa nova superfície como demonstrado pelos ensaios de adesão e proliferação celular nas condições estabelecidas por este estudo.

7 CONCLUSÕES

Considerando a proposição do estudo realizado com amostras de titânio puro grau II para avaliar a resposta celular em novas superfícies modificadas por nitretação em plasma, pode-se concluir que:

1. A nitretação de titânio por descarga luminescente foi eficaz na modificação da topografia e na alteração da estrutura química da camada superficial.
2. Para mesmas pressões e temperaturas de trabalho, observou-se que em gaiola catódica, a superfície é mais rugosa que na configuração planar.
3. A nitretação a plasma é capaz de produzir superfícies com características hidrofílicas principalmente na configuração de gaiola catódica.
4. A molhabilidade da superfície foi maior nas amostras com maior rugosidade.
5. Ambas as configurações produzem superfícies compatíveis com adesão e proliferação de células pré-osteoblásticas.
6. A adesão celular é influenciada pela composição química e rugosidade da superfície do substrato.

8 REFERÊNCIAS*

Abdzina V, Deliloglu-Gürhan I, Özdal-Kurt F, Sen BH, Tereshko I, Elkin I, Bđak S, Muntele C, Ila D. Cell adhesion study of the titanium alloys exposed to glow discharge. Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. 2007, B 261:624-626.

Agnieszka M-N, Nowakowisk R. AFM of titanium nitride layers prepared under glow discharge conditions. Journal of Alloys and Compounds. 2006, 424:272-278

Ahmed, NAG. Ion plating technology. New York, Wiley, 1987. 171p.

Albrektson T, Branemark P-I, Hasson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Acta Orthop Scand. 1981;52:155-170.

Alves Jr, C. Nitretação em plasma pulsado: equipamento, preparação e caracterização da camadas nitretadas. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 1995.

Alves Jr. Nitretação a plasma: Fundamentos e aplicações. EDUFRN. Natal. Brasil. 2001. 124p.

Alves Jr. C, da Silva EF, Martinelli AE. Effect of workpiece geometry on the uniformity of nitrided layers. Surf. Coat. Technol. 2001, 201:2450-2454.

Alves Jr. C, de Araújo, FO, Ribeiro, KJB, da Costa, JAP, Sousa RRM, Sousa RS. Use of cathodic Cage in plasma nitriding. Surf. Coat. Technol. 2006, 139:1-5.

Alves Jr. C, Guerra Neto CLB, Morais GHS, da Silva CF, Hajek V. Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge. Surf. Coat. Technol. 2006, 200:3657-3663.

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medicals Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo:Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Amaral M, Lopes MA, Santos JD, Silva RF. Wettability and surface charge of Si_3N_4 -bioglass composites in contact with simulated physiological liquids. *Biomaterials*. 2002;23(20):4123-29.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000;1:667-681.

Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Lost A, Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surfaces roughnesses. *J Biom Mat Res*. 2000;49(2):155-66.

Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P et al. The relative influence of the topographic and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials*. 2000;21:1567-77

Anselme K, Bigerelle M, Noël B, Lost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res* 2002 mar 6; 60(4): 529-540.

Anselme K, Bigerelle M . Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion. *J Mater Sci: Mater Med*. 2006;17;471-479.

Aronson B-O, Lausmaa J, Kasemo B. Glow discharged plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials. *J Biom Mat Res*. 1997;35(1):49-73.

Bächle M, Kohal, R J. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Impl. Res*. 15, 2004,683-692.

Bagno A, Di Bello A. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mat Sci: Mat in Med*. 2004, 15:935-949

Bagno A, Genovese M, Luchini A, Dettin M, Conconi MT, Menti AM, Parnigotto PP, Di Bello C. Contact profilometry and correspondence analysis to correlate surface properties and cell adhesion in vitro of uncoated and coated Ti an Ti6Al4V. *Biomaterials*. 2004;25;2437-2445.

Baier, RE. Implant dentistry forefront '85: surface preparation. *J. Oral. Implantol.*, 1986;12(3): 389-395.

Bess E, Cavin R, MA K, Ong JL. Protein adsorption and osteoblast responses to heat-treated titanium surfaces. *Implant Dental* 1999; 8(2): 126-132.

Bränemark, P.-I, Breine U, Lindström, J. et al intra-osseous anchorage of dental prostheses. I – experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg. 1969;3:81.

Bränemark P.-I, Zarb GA, Albrektsson T. Tissue integrated prostheses. In: Osseointegration in clinical dentistry. Chicago: Quintessence Publ. Co. Inc. 1985.

Brunette DM. The effects of implant surface topography on the behavior of cells. Int J Oral Maxillofac Implants. 1988;3(4):231-46

Brunette DM. *In vitro* models of biological responses to implants. Adv Dent Res. 1999 jun; 13:35-37.

Castellani R, Ruijter A, Renggli H, Jansen J. Response of rat bone marrow cells to differently roughened titanium discs. Clinical Oral Implants Research 1999; 10: 369-378.

Cheung NW. Processing considerations with plasma immersion ion implantation. Surface Coatings Technology. 2002;156:24-30.

Chien C-C, Liu K-T, Duh J-G, Chang K-W, Chung K-H. Effect of nitride film coatings on cell compatibility. Dental Materials. 2008; 24: 986-93.

Chim H, Ong JL, Schantz J-T, Hutmacher DW, Agrawal CM. Efficacy of glow discharge gas plasma treatment as a surface modification process for three-dimensional poly(D,L-lactide) scaffolds.

Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. Int J Oral Maxillofac Implants. 1998;13:163-74.

Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. J Prosthet Dent. 2000; 84(5):522-34.

Czarnowska E, Wierchon T, Maranda-Niedbala A. Properties of the surface layers on titanium alloy and their compatibility in in vitro tests. Journal of Materials Processing Technology. 1999; 93-92:190-194.

Czyrska-Filemonowicz A, Buffat PA, Lucki M, Moskalewicz T, Rakowski W, Lekki J, Wierzchón T. Transmission electron microscopy and atomic force microscopy characterization of titanium-base alloys nitride under glow discharge. Acta Materiale 2005, 53:4367-4377.

Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. Biomaterials 2001; 22(11): 1241-1251.

Eisenbarth E, Linez P, Biehl V, Velten D, Breme J, Hildebrand HF. Cell orientation and cytoskeleton organization on ground titanium surfaces. *Biomolecular Engineering* 2002; 00: 1-5.

Faghihi S, Azari F, Li H, Bateni MR, Szpunar A, Vali H, Tabrizian M. The significance of crystallographic texture of titanium alloy substrates on pre-osteoblast responses. *Biomaterials* 2006;27:3532-3539.

Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblasts. *Biomaterials*. 2003;24:4663-70

Figueroa CA, Alvarez F. On the hydrogen etching mechanism in plasma nitriding of metals. *Applied Surface Science*. 2006 253:1806-1809.

Fouilland L et al. Composition and tribological characterization of chemically vapour-deposited TiN layer. *Surf Coat Technol.*1998;100-101(1-3):146-148.

Guerra Neto, CLB. Novas superfícies para implantes dentais obtidas por nitretação em plasma. (Dissertação), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN),2001.

Guerra Neto, CLB. Avaliação da osseointegração de implantes de titânio nitretados em plasma. (Tese), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN),2006.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In Vitro models of biocompatibility: A review. *Dent Mater*. 1996;12(3):186-93.

Huang H-H, Ho C-T, Le T-H, Lee T-L, Liao K-K, Chen F-L. Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomol. Eng.* 2004;21:93-97

Ikeda D, Ogawa M, Hara Y, Nishimura Y, Odusanya O, Azuma K et al. Effect of nitrogen plasma-based ion implantation on joint prosthetic material. *Surface and Coatings Technology*. 2002;156:301-305.

Jansey JA et al. Histologic evaluation of the osseous adaptation to titanium and hydroxyapatite-coated titanium implants. *J. Biomed Mater. Res.* 1991;25(8): 973-98.

Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann H-P. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*. 2004; 25:625-31.

Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *J. prosth. Dent*. 1983;49(6):832-837.

Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988; 3: 247-259.

Kasemo B. Biomaterial and implant surfaces: A surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 3(4):247-59.

Kasemo B. Biological surface science. *Surface Science*. 2002; 500:656-77.

Kawahara H., Aoki H, Koike H, Kawahara D, Matsuda S. No evidence to indicate topographic dependency on bone formation around cp titanium implants under masticatory loading. *J Mater Sci:Mater Med*. 2006; 17: 727-34.

Kawai H, Shibata Y, Miyazaki T . Glow discharge plasma pretreatment enhances osteoclast differentiation and survival on titanium plates. *Biomaterials*. 2004;25:1805-1811.

Kilpadi DV, Lemons JE. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *J Biom Mat Res*. 1994;28:1419-25.

Kohles SS, Clark MB, Brown CA, Kenealy JN. Direct assessment of profilometric roughness variability from typical implant surface types. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004, 19:510-516.

Lakshmi SG, Arivuoli D, Ganguli B. Surface modification and characterization of TiAlV alloys. 2002; 76:187-190.

Lampin M, Warocquier-Clérout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration. *Biomaterials*. 1997;36(1):99-108.

Lakshmi SG, Arivuoli D, Ganguli B. Surface modification and characterization of Ti-Al-V alloys. *Materials Chemistry and Physics*. 2002,76:187-190.

Lavos-Valereto IC, Deboni MCZ, Azambuja N, Marques MM. Evaluation of the titanium Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating on growth and viability of cultured osteoblast-like cells. *J Periodontol*. 2002;73:900-905.

Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials*. 2007;23:844-854.

Lim YJ, Oshida Y, Andres CJ, Barco MT. Surface characterization of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16(3):333-42.

Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998; 19: 2219-2232.

Linez-Bataillon P, Monchau F, Bigerelle M, Hildebrand HF. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. *Biomolecular Engineering* 2002; 19: 133-141.

Lumbikanonda N, Sammons R. Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. *Int J oral Maxillofac Implants.* 2001;16(5):627-36.

Mändl S, Rauschenbach B. Improving the biocompatibility of medical implants with plasma immersion ion implantation. *Surface and Coatings Technology.* 2002;156:276-83.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995; 29(3): 389-401.

Mekayarajjananonth T, Winkler S. Contact angle measurements on dental implant biomaterials. *J Oral Implant.* 1999;25(4):230-36.

Mezger PR, Creugers NHJ. Titanium nitride coatings in clinical dentistry. *J. Dent,* 1992;20:342-344.

Mcmillan PJ, Riggs ML, Bogle GC, Crigger M. Variables that influence the relationship between osseointegration and bone adjacent to an implant. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15(5): 654-661.

Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12(5): 515-525.

Nebe B, Lüthen F, Lange R, Becker P, Beck P, Beck U, Rychly J. *Mat Science Eng.* 2004, C24:619-624.

Ong JL, Prince CW, Raikar GN, Lucas LC. Effect of surface topography of titanium on surface chemistry and cellular response. *Implant Dent.* 1996;5(6):83-8.

Parr G R, Gardner, LK., Toth, RW. Titanium: the mystery metal of implants dentistry: dental materials aspects. *J. Prosth. Dent.* 1985;54(3): 410-414.

Parsegian VA. Molecular forces governing tight contact between cellular surfaces and substrates. *J. Prosth. Dent.* 1983; 49(6): 838-842.

Placko HE, Mishra S, Weimer JJ, Lucas LC. Surface characterization of titanium based implant materials. *Int j Oral MAxillofac Implants.* 2000;15:355-63.

Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior. *Materials Science and Engineering.* 2003;C23:551-60.

Ratner BD, Johnston AB, Lenk TJ. Biomaterials surfaces. *J Biomed Mater Res: Applied Biomat.* 1990;21(7):847-860.

Rausch-Fan X, Qu Z, Wieland M, Matejka M, Schedle A. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblast compared to osteoblast-like cells in response to titanium surfaces. *Dental materials,* 2007, 1108.

Rosa AL, Beloti MM, van Noort R. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells an hydroxyapatite with different surface topography. *Dent Mat.* 2003;19:768-772

Rosa AL, Beloti MM. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14:43-48.

Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials.* 2004;25:1429-38.

Santos CA . Composição superficial e propriedades mecânicas e tribológicas de aços – carbono implantado com nitrogênio. Porto Alegre, 1987. Tese (Doutorado) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials: advantages and limitations. *J Dent.* 1994;22(2):s6-s11.

Schmidt C, Kaspar D, Sarkar MR, Claes LE, Ignatius AA. A scanning electron microscopy study of human osteoblast morphology on five orthopedic metals. *J Biomed Mater Res* 2002 feb 28; 63(3): 252-261.

Shibata Y, Hosaka M, Kawai H, Miyazaki T. Glow discharge plasma treatment of titanium plates enhances adhesion of osteoblast-like cells to the plates through the integrin-mediated mechanism. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17:771-77.

Shibata Y, Miyazaki T. Anode glow discharge plasma treatment enhances calcium phosphate adsorption onto titanium plates. *J Dent Res.* 2002;81(12):841-4.

Sinha RK, Morris F, Suken BS, Shah SA, Tuan RS. Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading, and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Rel Res.* 1994;35:258-72.

Sobiecki JR, Wierzchón T, Rudnicki J. The influence of glow discharge nitriding, oxynitriding and carbonitriding on surface modification of Ti-1Al-1Mn titanium alloy. *Vaccum* 2002, 64:41-46.

Sovak G, Weiss A, Gotman I. Osseointegration of Ti6Al4V alloy implants coated with titanium nitride by a new method *Journal of Bone and Joint Surgery – B* 2000; 82(2).

Sul, Y-T, Johansson C, Wennerberg A, Cho L-R, Chang B-S, Albrektsson. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:349-359.

Swart KM, Keller JC, Wightman JP, Draughn RA, Stanford CM, Michaels CM. Short-term plasma-cleaning treatments enhance *in vitro* osteoblast attachment to titanium. *Journal Oral Implant* 1992; 18(2): 130-137.

Sykaras N, Iacopino A, Marker VA, Triplett RG, Woody R. Implant materials, designs, and surface topographys: Their effect on osseointegration. A literature review. *Int J oral Maxillofac Implants.* 2000;15:675-690.

Vanzillotta PS, Soares GA, Bastos IN, Simão RA, Kuromoto NK. Potentialities of some surface characterization techniques for the development of titanium biomedical alloys. *Materials Research.* 2004;7(3):437-444.

Wennerberg A. The importance of surface roughness for implant incorporation. *Int J Mach Tools Manufact.* 1999;38(5-6):657-62.

Wennerberg A, Albrektson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J oral Maxillofac Implants.* 2000;15:331-344.

Wirth C, Grosgeat B, Lagneau C, Jaffrezic-Renault N, Ponsonnet L. Biomateril surface properties modulate in vitro rat calvaria osteoblast response: Roughness and or chemistry? *Materials Science and Engineering.* 2008. C 28; 990-1001.

Xavier SP, Carvalho PSP, Beloti MM, Rosa AL. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. *J Dent.* 2003;31:173-80.

Yamamoto H, Shibata Y, Miyazaki T. Anode glow discharge plasma treatment of titanium plates facilitates adsorption of extracellular matrix proteins to the plates. *Biomater and Bioeng.* 2005;84(7):668-671.

Yilbas B. et al. Plasma nitriding of Ti-6Al-4V alloy to improve some tribological properties. *Surf Coat Technol*, v. 80, p. 287-292, 1996.

Yliheikkilä PK, Felton DA, Whitson SW, Ambrose WW, Uoshima K, Cooper LF. Correlative microscopic investigation of the interface between titanium alloy and the osteoblast-osteoblast matrix using mineralizing cultures of primary fetal bovine mandibular osteoblasts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995; 10(6): 655-665.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS Standard practice for choice of sample size to estimate a measure of quality for a lot or process. Annual Book of ASTM Standards. V. 14.02, Philadelphia, Pa , 1989.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS Standard recommended practice for surface preparation and marking of metallic surgical implants. ASTM standard F86. Philadelphia, Pa , 1976.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Writing and editing for biomedical publication [text on the Internet]. Vancouver[Canada]; update 2004 oct [cited 2005 Jan 21]. Available from: <http://www.icmje.org>

List of journals indexed in Index Medicus. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entre/journals/loftext_noprov.html

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de biblioteca e Documentação. Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias/ elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi/ Maria Fananelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Sueli Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2004.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estruturas e referências. 2ª ed. rev. e ampl. São Paulo, 2005.

APÊNDICE

Morfologia celular das Células aderidas nas diferentes superfícies do titânio em 24 horas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

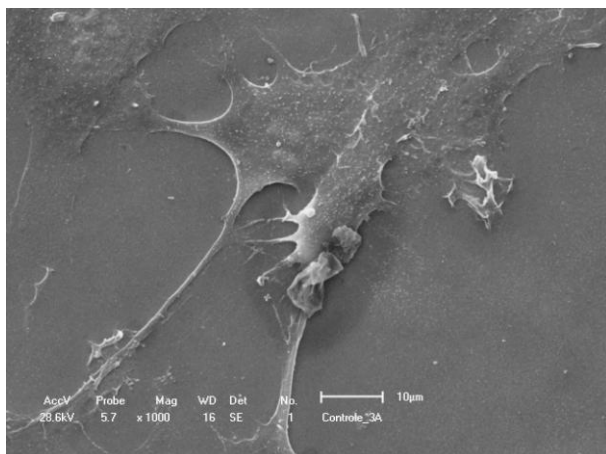


Figura 1 - Adesão celular no titânio polido

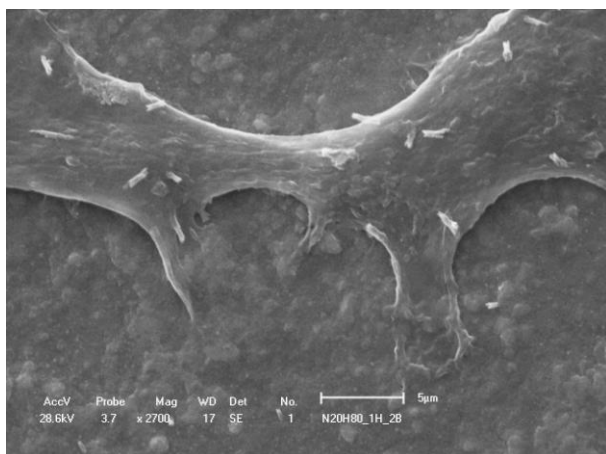


Figura 2 - Adesão celular no titânio nitretado em modo planar

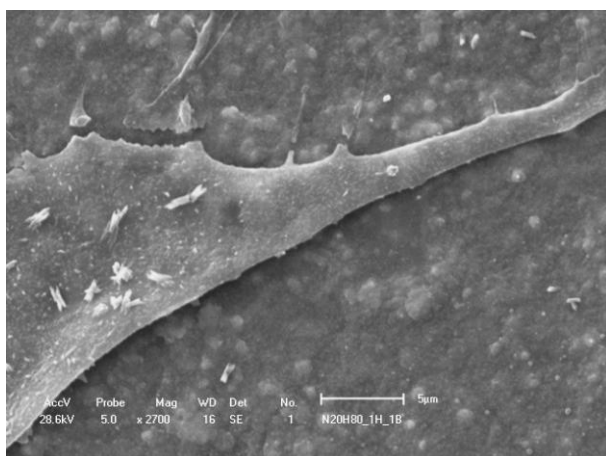


Figura 3 - Adesão celular no titânio nitretado em gaiola catódica

Morfologia celular das Células aderidas nas diferentes superfícies do titânio em 24 horas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

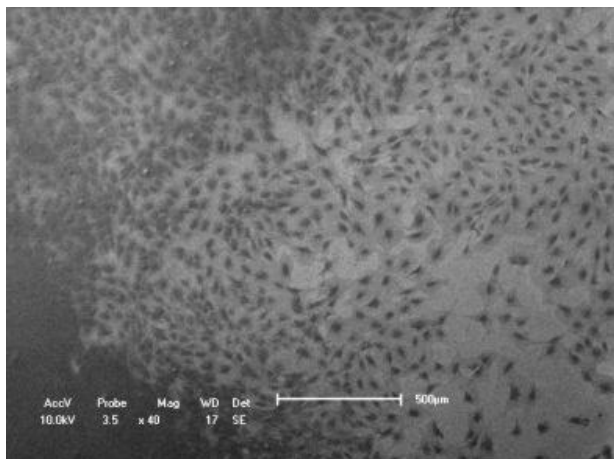


Figura 4 - Adesão celular no titânio polido

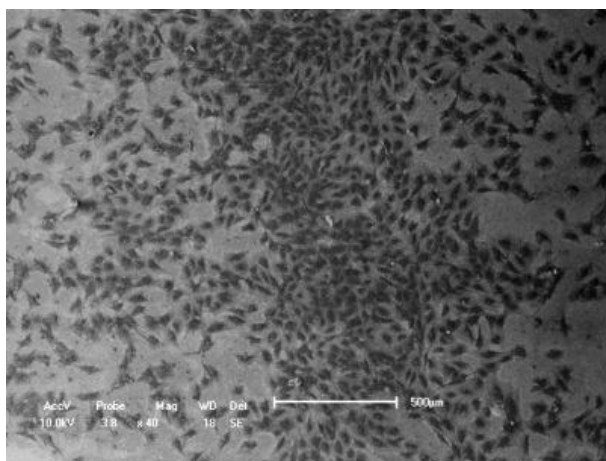


Figura 5 - Adesão celular no titânio nitretado em modo planar

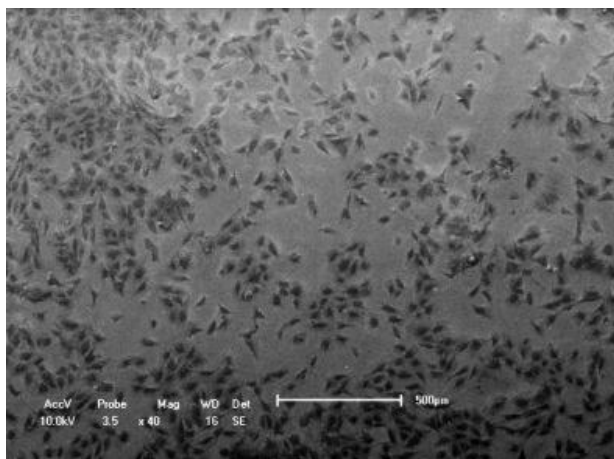


Figura 6 - Adesão celular no titânio nitretado em gaiola catódica

Textura das diferentes superfícies dos discos de titânio por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

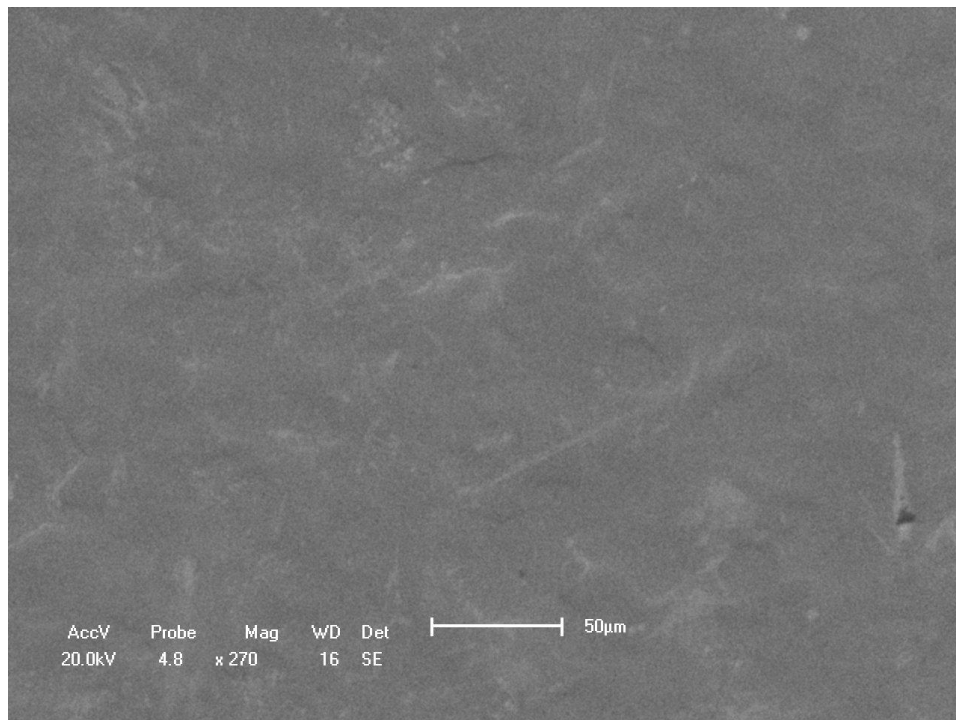


Figura 1- MEV amostra polida em sílica coloidal

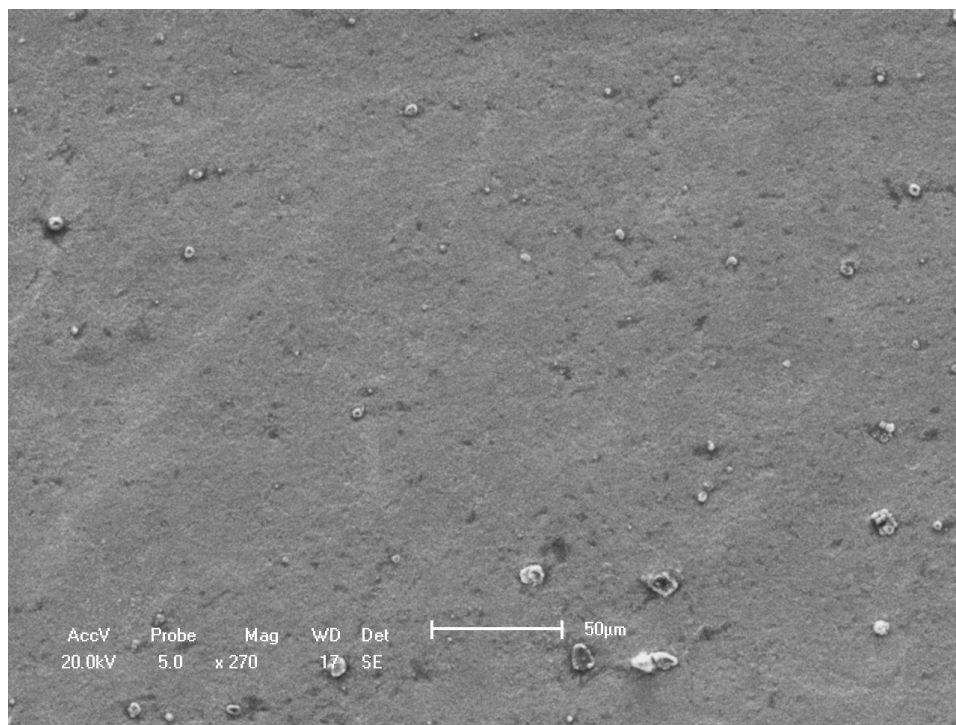


Figura 2 - MEV amostra nitretada em configuração planar

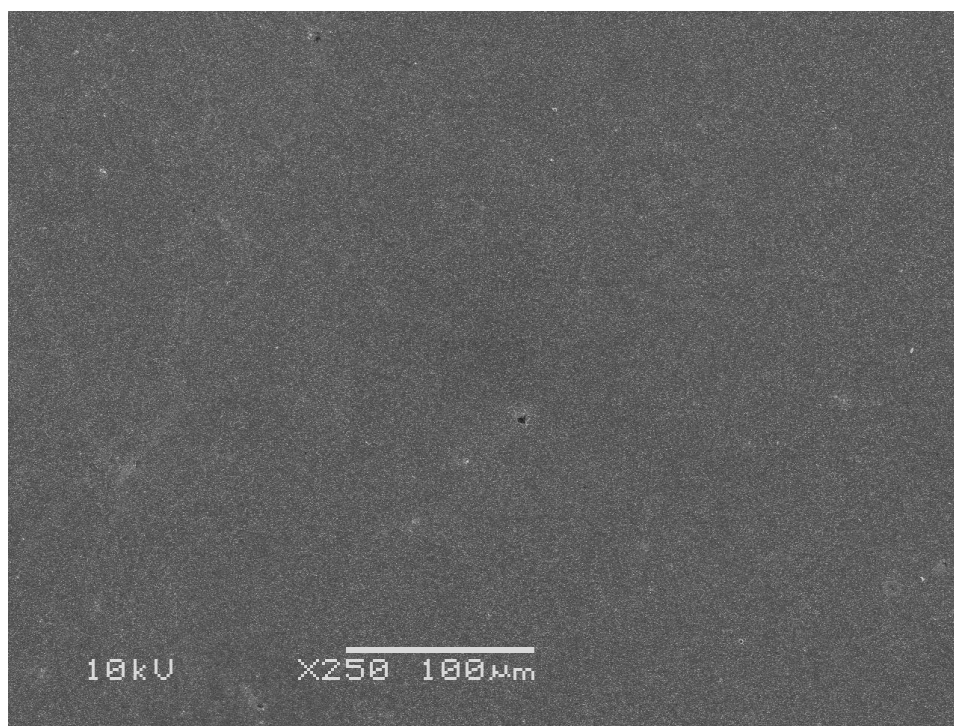


Figura 3 - MEV amostra nitretada em configuração de gaiola catódica

Topografia das diferentes superfícies dos discos de titânio por microscopia de força atômica

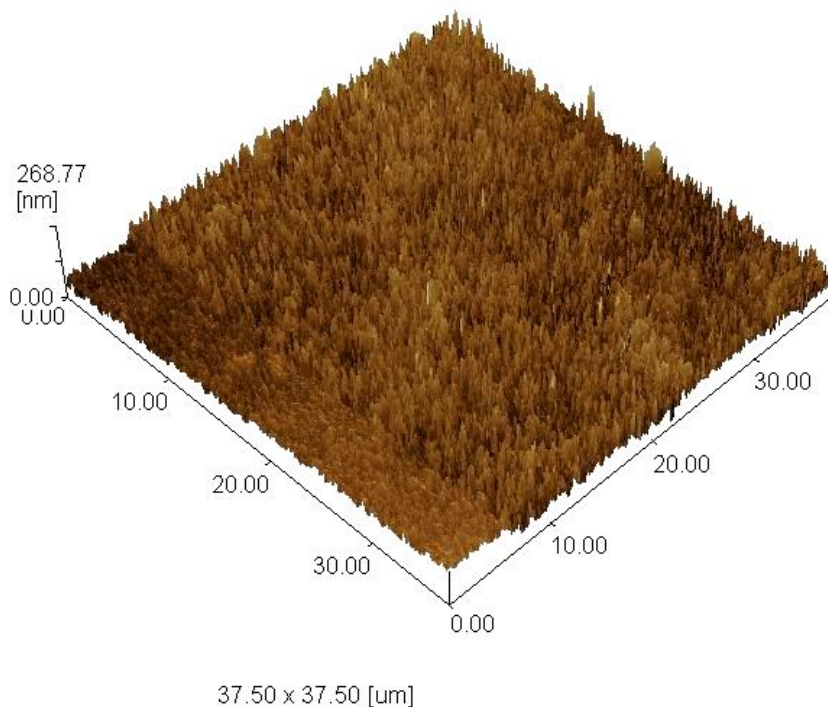


Figura 7 - Microscopia de força atômica de amostra nitretada em plasma com configuração de gaiola catódica

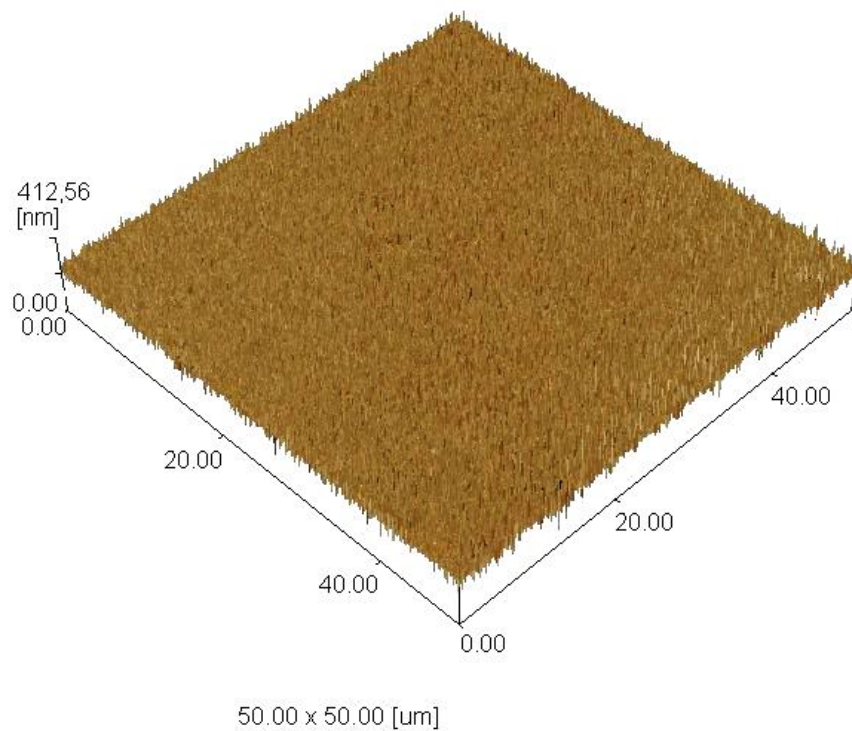


Figura 8 - Microscopia de força atômica de amostra nitretada em plasma com configuração de gaiola catódica

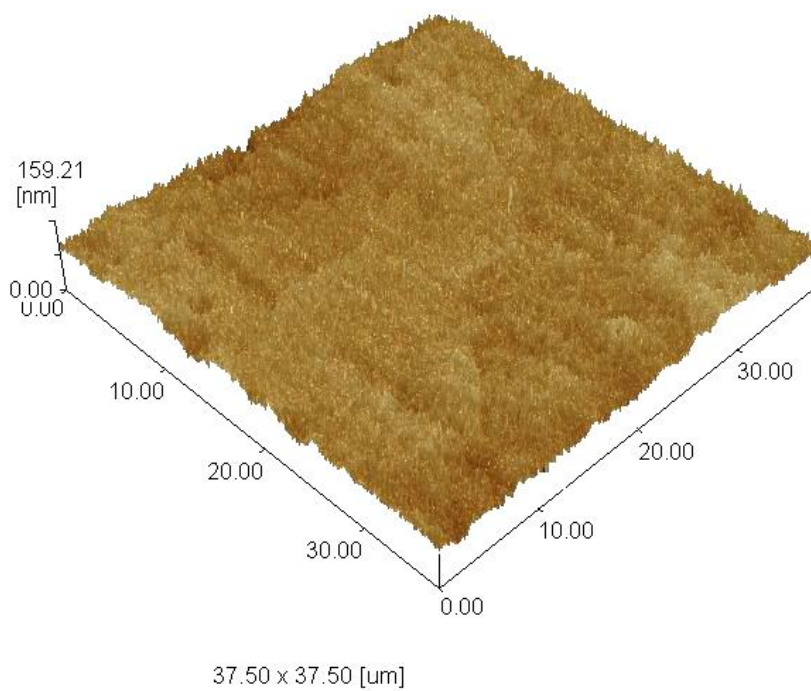


Figura 9 - Microscopia de força atômica de amostra nitretada em plasma com configuração plana

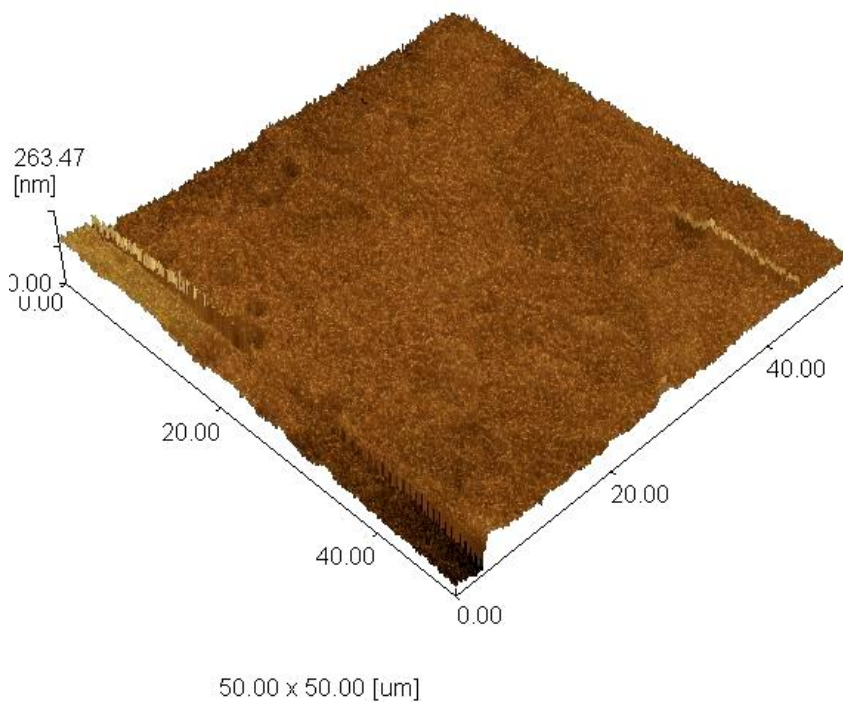


Figura 10 - Microscopia de força atômica de amostra nitretada em plasma com configuração planar

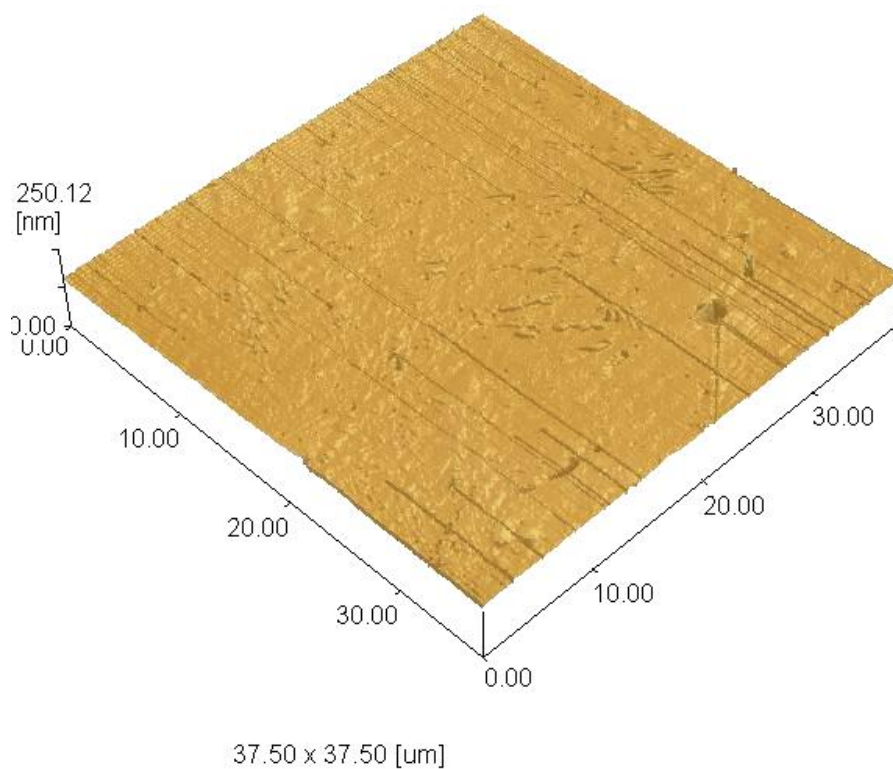


Figura 11 - Microscopia de força atômica de amostra polida com sílica coloidal

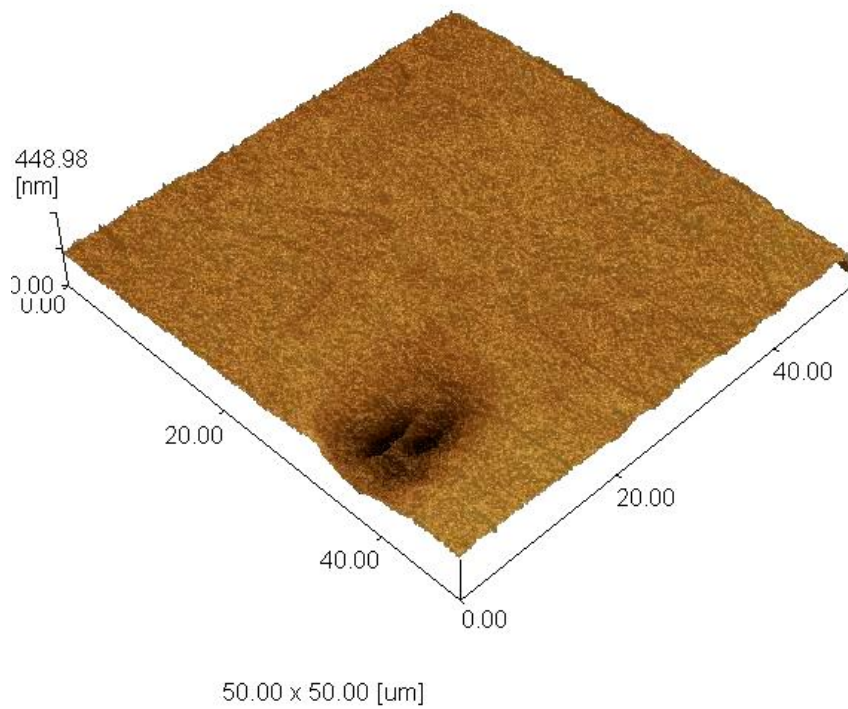


Figura 12 - Microscopia de força atômica de amostra polida com sílica coloidal