Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Desenvolvimento de materiais bioinspirados contendo Sr^{2+}
para modificação de superfícies de Ti”.**

Marcos Antônio Eufrásio Cruz

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2017

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

VERSÃO CORRIGIDA

**“Desenvolvimento de materiais bioinspirados contendo Sr^{2+}
para modificação de superfícies de Ti”.**

Marcos Antônio Eufrásio Cruz

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ramos

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2017

VERSÃO CORRIGIDA

FICHA CATALOGRÁFICA

Cruz, Marcos Antônio Eufrásio

Desenvolvimento de materiais bioinspirados contendo Sr^{2+} para modificação de superfícies de Ti. Ribeirão Preto, 2017.

115 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Ramos, Ana Paula.

1. Titânio. 2. Estrôncio. 3. Filmes Langmuir-Blodgett. 4. Flavonóides
5. Carbonatos 6. Colágeno

“Bottom line. If you love yourself, it will all work out.”

*À minha mãe, meu maior exemplo
de humildade e doação ao próximo.*

Agradecimentos

A Deus e aos espíritos de luz do Universo pela proteção contínua e por guiarem meu caminho na busca de um futuro melhor.

À minha família. Meus pais Sônia e Hélio por todo apoio, pela confiança em minhas atitudes e por tomarem para si mesmos os meus sonhos e as minhas vitórias. Agradeço também as minhas irmãs Bruna e Nathalia por todo apoio e compreensão.

À Prof. Ana Paula. Agradeço pela oportunidade que me foi concedida e pela confiança. Agradeço pela liberdade em apoiar minhas escolhas e por estar sempre presente quando parece que deu tudo errado. Sou grato pelos seis anos que se passaram e ansioso pelos próximos que virão.

A todos os membros do Laboratório de Físico-Química de Colóides e Superfícies, aos atuais e aos que já se foram. Mais do que um ambiente de trabalho a ser compartilhado, transformamos nossa rotina num ambiente de muita alegria e amizade que levarei para a vida toda. Agradeço à Camila pela amizade sempre presente, companheira dos experimentos e do dia a dia. Ao Lucas, sempre com carinho e nos trazendo um pouco de alegria. A Thais, por ter aceitado nosso jeitinho e ser uma companhia tão agradável.

Ao Laboratório do Professor Pietro Ciancaglini pela colaboração com os experimentos de cultura de osteoblastos.

Ao Wallance Pazin e ao Prof. Amando Ito (Depto de Física Médica, FFCLRP) pelos experimentos de fluorescência.

Ao Professor Seung-Wuk Lee (Universidade da Califórnia, Berkeley, EUA) por ter me recebido em seu laboratório e me engajado em sua pesquisa de nanotecnologia, sempre com muita paciência e pronto para dar novas ideias.

Ao CNPq e à Fapesp pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de mestrado (Processo 15/08774-0) e bolsa BEPE para estágio no exterior (Processo 16/19677-9).

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1 -

Introdução

1. A interface implante-tecido e o controle do processo de osseointegração em biomateriais Erro! Indicador não definido.
2. Uma visão simplificada da osteogênese 19
3. Biominerais e métodos para sua deposição em superfícies 23
4. Papel do Sr^{2+} no tecido ósseo 27
5. Monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett 29

CAPÍTULO 2 - *Crescimento de filmes híbridos contendo CaCO_3 e ou SrCO_3 sobre superfícies de Ti mediado por filmes Langmuir-Blodgett*

1. Introdução 36
2. Parte Experimental 37
 - 2.1. Formação dos filmes híbridos 37
 - 2.1.1. Pré-tratamento das Superfícies 37
 - 2.1.2. Estudo das monocamadas de Langmuir na interface líquido-ar 37
 - 2.1.3. Modificação das Superfícies Metálicas por filmes LB 37
 - 2.1.4. Avaliação *in vitro* da bioatividade 38
 - 2.1.5. Análise da morfologia dos filmes híbridos 38
 - 2.1.6. Caracterização da composição química e estrutural 38
 - 2.1.7. Molhabilidade e energia livre de superfície 39
 - 2.2. Cultura *in vitro* de osteoblastos 39
 - 2.2.1. Isolamento e cultura de células mesenquimais de medula óssea de ratos 39
 - 2.2.2. Viabilidade celular 40
 - 2.2.3. Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) 40
 - 2.2.4. Quantificação de nódulos de mineralização 41
 - 2.2.5. Análise da morfologia dos osteoblastos 41
3. Resultados e discussão 42
 - 3.1. Caracterização físico-química dos filmes híbridos 42
 - 3.2. Resposta biológica *in vitro* dos filmes híbridos 51

4.	Conclusões.....	54
----	-----------------	----

CAPÍTULO3 - *Síntese, caracterização espectroscópica e formação em monocamadas de Langmuir do complexo morina-Sr²⁺*

1.	Introdução	56
1.1.	Estrutura e características espectrais dos flavonóides	57
2.	Parte Experimental.....	62
2.1.	Síntese e caracterização espectroscópica	62
2.1.1.	Estudo da formação do complexo morina-Sr ²⁺ por espectroscopia de absorção no UV-Vis	62
2.1.2.	Medidas de fluorescência estática	62
2.1.3.	Medidas de fluorescência resolvida no tempo.....	62
2.1.4.	Isolamento e caracterização do complexo morina-Sr ²⁺	63
2.2.	Formação do complexo morina-Sr ²⁺ em monocamadas de Langmuir	64
2.2.1.	Estudo das monocamadas	64
2.2.2.	Microscopia de fluorescência acoplada à cuba de Langmuir	64
2.2.3.	Microbalança a cristal de quartzo	65
3.	Resultados e Discussão	66
3.1.	Síntese e caracterização do complexo morina-Sr ²⁺	66
3.2.	Formação do complexo morina-Sr ²⁺ em monocamadas	72
4.	Conclusões.....	77

CAPÍTULO4 - *Filmes automontados de colágeno*

1.	Introdução	79
2.	Parte Experimental.....	85
2.1.	Preparação da solução de colágeno	85
2.2.	Produção de filmes finos de colágeno tipo I.....	86
2.3.	Caracterização da topografia das superfícies por microscopia de força atômica	86
3.	Resultados e Discussão	87
4.	Conclusões.....	102

PERSPECTIVAS -

REFERÊNCIAS -

RESUMO

Ao longo dos últimos anos, Sr^{2+} tem sido aplicado em estudos *in vitro* e *in vivo* como um importante agente para o estímulo de osteogênese. Dessa forma, a criação de matrizes bioativas contendo Sr^{2+} é uma tendência na área de modificações de superfícies metálicas para aplicações em implantes de substituição óssea. Nesta dissertação, desenvolvemos sistemas bioinspirados que possam atuar como carreadores de Sr^{2+} em biomateriais. Na primeira parte, superfícies de Ti foram modificadas com filmes híbridos contendo SrCO_3 e ou CaCO_3 . A formação dos filmes híbridos foi mediada pela deposição de filmes Langmuir-Blodgett sobre superfícies de Ti. Essas matrizes altamente organizadas atuaram como molde para a deposição de filmes híbridos contínuos e homogêneos sobre as superfícies. A resposta biológica desses materiais foi avaliada por cultura de osteoblastos *in vitro*, indicando que os materiais não são tóxicos e, em especial, que a associação entre SrCO_3 e CaCO_3 dá origem a recobrimentos com composição e propriedades superficiais otimizadas que induzem melhores respostas osteogênicas. Na segunda parte, foi sintetizado um novo complexo entre morina e Sr^{2+} . A estrutura desse complexo foi inspirada no fármaco ranelato de estrôncio, um dos compostos mais utilizados para o tratamento da osteoporose. Dessa forma, aliamos a propriedade antioxidante da morina, um flavonóide natural, e a atividade osteogênica do Sr^{2+} para desenvolver um novo composto bioativo. A estrutura do complexo morina- Sr^{2+} foi caracterizada por diferentes técnicas espectroscópicas, onde determinamos que a complexação ocorre com a estequiometria 1:1. Visando o desenvolvimento de recobrimentos bioativos para superfícies metálicas, estudamos também a complexação entre morina e Sr^{2+} em monocamadas de Langmuir. Através da caracterização físico-química das monocamadas contendo morina na presença de Sr^{2+} , observamos que é possível formar multicamadas auto-organizadas contendo o complexo morina- Sr^{2+} sobre superfícies sólidas. Essas matrizes mostram-se promissoras para uso em modificações de superfícies com propriedades osteogênicas. Por fim, o último sistema apresentado nessa dissertação é a criação de matrizes auto-organizadas de colágeno tipo I, mimetizando a organização hierárquica dessa proteína no tecido ósseo. Para isso, a auto-organização das fibrilas de colágeno sobre superfícies sólidas foi mediada por um processo onde o substrato é lentamente emerso de uma solução contendo moléculas de colágeno. Essa emersão faz com que forças competitivas (fricção e tensão superficial) atuem na interface sólido-líquido-ar e promovam o alinhamento das fibrilas de colágeno auto-organizadas no menisco da solução/substrato. A estrutura dos filmes finos assim formados foi caracterizada e mostrou-se ser dependente da concentração, pH e força iônica da solução de colágeno. Filmes de colágeno altamente orientados formados por essa metodologia poderão ser utilizados como sistemas carregadores de Sr^{2+} através da biomineralização de hidroxiapatita. Por fim, nessa dissertação foram apresentados três sistemas distintos com um ponto comum: a atuação como matrizes carreadoras de Sr^{2+} . Por meio da densa caracterização da composição e das propriedades superficiais, mostramos que esses sistemas são promissores para o uso como recobrimentos bioativos sobre superfícies de Ti.

ABSTRACT

In the past few years, Sr^{2+} has been described to play a fundamental role on the bone osteogenesis, as demonstrated by *in vitro* and *in vivo* studies. Therefore, the design of bioactive coatings containing Sr^{2+} is an interesting approach to modify metallic implants for bone regeneration. Herein, we described the development of bio-inspired systems to act as carriers of Sr^{2+} in biomaterials. In the first section, Ti surfaces were modified by hybrid films containing SrCO_3 and or CaCO_3 . The formation of hybrid films was mediated by the deposition of Langmuir-Blodgett films on the Ti surfaces. Those matrices act as a template for the organized nucleation and growth of biominerals. By this methodology, continuous and homogeneous thin films were formed on the Ti surfaces. The biological response was accessed by *in vitro* osteoblasts culture. The hybrid films were nontoxic to the osteoblasts and we observed that the association of SrCO_3 and CaCO_3 resulted in a coating displaying a synergic composition and surface properties that induced better metabolic responses on the cultured osteoblasts. In the second section, we described the synthesis of a new Sr^{2+} -morin complex. The structure of the complex was inspired by the strontium ranelate, one of the most used drugs for osteoporosis treatment. This way, we aimed to ally the antioxidant properties of morin, a natural flavonoid compound, and the osteogenic behavior of Sr^{2+} to design a new bioactive compound. The chemical structure of the complex was determined by spectroscopic techniques and we observed that the complexation happens at the stoichiometry 1:1. To design bioactive coatings on Ti surfaces, we also performed the complexation between the strontium and morin directly on Langmuir monolayers. By physicochemical characterization, we identified that multilayers containing the Sr^{2+} -morin complex can be built on solid supports. These results show that Sr^{2+} -morin can be a promising approach to design biofunctional coatings on metallic surfaces. In the last section, we described the creation of hierarchical collagen thin films, mimetizing the structure found on bone tissue. To this, solid supports were pulled out from collagen solution at a controlled rate. In this approach, the self-templating is mediated by competing forces (i.e. surface tension and friction) that act in the meniscus placed between the solution and the support. This process allows the deposition of self-aligned collagen fibers on surfaces. The film's structure was characterized and is dependent on pH, pulling rate, ionic and collagen concentration of the solution. In the future, these films will be applied to create mineralized functional coatings containing Sr^{2+} . In conclusion, the materials developed herein has an important point in common: they are different matrices to carry Sr^{2+} ions. By the composition and surface characterization performed herein, we believe that these materials can be applied in the design of biofunctional coatings for metallic implant surfaces.

CAPÍTULO 1

Introdução

1. A interface implante-tecido e o controle do processo de osseointegração em biomateriais

Desde a década de 1950, o metal titânio (Ti) tem sido o material padrão utilizado no desenvolvimento de implantes para aplicações dentárias e ortopédicas¹. Um requisito para o sucesso de um material implantado é que ele exiba propriedades mecânicas similares à do tecido ósseo, e nesse sentido a dureza e propriedades elásticas do Ti o torna um dos materiais mais utilizados para esse fim. Ti e suas ligas (com alumínio ou vanádio, geralmente) são materiais bem descritos na literatura médica para o desenvolvimento de implantes dentários e ortopédicos^{2,3}. Biomateriais baseados em Ti apresentam alta biocompatibilidade e resistência à corrosão, que são propriedades fundamentais para um material implantável. A alta biocompatibilidade do Ti surge da formação espontânea de uma estável e inerte camada de óxido sobre sua superfície, que resulta em alta resistência à corrosão e baixa tendência de formação de espécies iônicas em meio aquoso³. Implantes baseados em Ti apresentam alta resistência à carga e excelente performance mecânica, cujas propriedades semelhantes às do tecido ósseo regulam positivamente a especificação fenotípica de células osteogênicas⁴. Apesar de suas propriedades excepcionais como biomaterial para implantes ósseo, alguns aspectos que precisam ser melhorados têm sido levantados. Por exemplo, implantes de Ti podem resultar na ineficiente osteointegração do material implantado. Osteointegração é um fator primordial para o sucesso de um biomaterial e é definida como a completa ancoragem entre o tecido ósseo e o material implantado, obtida através da formação de uma estável e complexa interface implante-tecido⁵. O insucesso de um material implantado pode ser causado pela formação de uma camada de tecido fibroso que isola o biomaterial do tecido hospedeiro¹. Além disso, apesar de a natureza inerte do Ti ter sido inicialmente considerada uma propriedade favorável ao desenvolvimento de implantes, essa inércia o torna um material com pouca habilidade em controlar respostas imunológicas ou gerar respostas específicas em células osteogênicas¹. Dessa forma, diferentes métodos de modificação de superfícies têm sido propostos para implantes metálicos de modo a otimizar suas propriedades superficiais e induzir respostas específicas no tecido hospedeiro.

Analisando-se a habilidade de um implante em gerar respostas específicas no tecido hospedeiro, observa-se alguns termos que são recorrentes na literatura: osteoindução, osteocondução e osteointegração. A osteoindução representa o processo

pelo qual a osteogênese é iniciada. Além de células osteogênicas (como os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos), ao redor do material implantado há diferentes células não-diferenciadas ou em estágios inferiores de diferenciação. Sendo assim, a osteoindução representa a habilidade do material em recrutar células não-diferenciadas e induzir a sua diferenciação em células osteogênicas⁶, processo esse fundamental para a cicatrização e a indução da formação do tecido ósseo. A formação do tecido ósseo é resultado da ação de células osteogênicas. Uma vez implantado o material, células osteogênicas podem estar inicialmente presentes na região do trauma ou podem ser o resultado da osteoindução causada pelo material. A habilidade do material em permitir o crescimento do tecido ósseo ao longo da sua superfície é chamada de osteocondução, processo esse dependente das suas propriedades superficiais⁶. Materiais tóxicos que não permitem a interação com células não serão osteocondutores. A consequência da habilidade do material em promover a osteoindução e a osteocondução é a sua osteointegração⁶.

O processo de osteointegração envolve uma cascata de eventos, que vão desde a adsorção de proteínas à superfície do implante até respostas imunológicas e o reconhecimento das superfícies por células mesenquimais e osteoblastos⁷⁻⁹. A ação orquestrada desses eventos é o que culmina na formação de tecido ósseo ao longo do biomaterial, criando uma robusta interface implante-tecido. Um dos primeiros eventos que ocorre após a implantação de um material é a adsorção de íons, moléculas de água, lipídeos e proteínas oriundos do fluido corpóreo sobre a superfície do implante¹⁰. Diferentes proteínas presentes na corrente sanguínea podem interagir com a superfície, sendo que algumas estão associadas com a resposta inflamatória do corpo (como fibrinogênio) e outras participarão do processo de adesão celular (como a fibronectina e a vitronectina)¹⁰. Uma das primeiras células que aproximam-se da superfície dos implantes são macrófagos e neutrófilos, responsáveis pela limpeza da região de injúria contra possíveis patógenos e tecido necrótico⁸. Outra classe de células importantes durante a colonização da superfície dos implantes são as células mesenquimais. Essas células possuem a habilidade de se diferenciarem em fibroblastos, osteoblastos e condrócitos, dependendo do ambiente em que se encontram e das propriedades superficiais do material. Todavia, o destino de células mesenquimais ao longo de implantes é em direção à diferenciação em células osteogênicas, que culminem na formação de tecido ósseo, embora possa ocorrer alguma formação de tecido mole ao redor do implante. Uma vez que o implante está acondicionado ao tecido hospedeiro, a

formação de tecido ósseo poderá ocorrer pela osteogênese no tecido ósseo que circunda o implante ou pela ação direta de osteoblastos recrutados sobre a superfície do implante (osteogênese de contato). A promoção da osteogênese de contato por um material é fundamental para o processo de osteointegração⁷. Após a ação inicial dos osteoblastos, a próxima etapa da osteointegração é a remodelagem óssea promovida pelos osteoclastos. Osteoclastos produzem proteases responsáveis pela remoção da matriz mineralizada óssea, corrigindo defeitos presentes no tecido ósseo recém-formado e preparando a superfície para o progresso do crescimento ósseo¹¹.

Tendo em vista a complexidade de eventos que ocorrem na interface implante-tecido, é fácil notar o papel exercido pelas propriedades superficiais no controle da osteointegração. A composição química, topografia e molhabilidade das superfícies irão ditar a interação entre o implante e o fluido corpóreo e células, sendo que a atuação sinérgica dessas propriedades é o que culminará no sucesso do material implantado. Por essa razão, são empregados diversos métodos para a modificação superficial de metais, manipulando-se tais parâmetros.

A topografia da superfície do implante tem a habilidade de controlar as interações com proteínas e células. Há um consenso na literatura que o aumento da rugosidade promove o aumento da integração *in vivo*, melhoria na estabilidade de implantes e redução do tempo necessário para a cura dos implantes metálicos^{12,13}. Dessa forma, a manipulação da topografia de superfícies de Ti tem sido densamente explorada, gerando materiais bem-sucedidos comercialmente, em especial com a usinagem de implantes para a criação de porosidade na escala micrométrica¹³. A manipulação da rugosidade pode ser na escala micro, sub-micro ou nanométrica, isto é, cujos defeitos na superfície terão pelo menos uma dimensão da ordem de 100 μm , 1 μm ou 100 nm, respectivamente. Os métodos mais utilizados para a manipulação da rugosidade de superfícies metálicas tem sido o jateamento por partículas, polimento, ataque químico por ácidos e oxidação eletrolítica^{3,12,14}. A topografia da superfície afeta a adesão, a proliferação e a diferenciação de células em biomateriais¹⁵. A síntese de colágeno, a adesão e a diferenciação de osteoblastos é maior em superfícies rugosas quando comparada às superfícies lisas^{8,16}. Dessa forma, a quantidade de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante é dependente de sua rugosidade¹⁷. A osteogênese inicia-se mais rapidamente em superfícies rugosas em nível nano ou sub-micrométrico quando comparado às superfícies lisas¹⁸. Além disso, a presença de poros, picos, ranhuras e outros elementos topográficos

na superfície pode criar pontos para a ancoragem de células ou a adsorção de proteínas^{19–22}. Apesar do sucesso obtido pela manipulação micrométrica da topografia de implantes quanto à osteointegração, o desenvolvimento de texturas organizadas em nível nanométrico tem chamado atenção para a obtenção de respostas biológicas específicas^{23,24}. Estudos recentes mostraram que superfícies de Ti com topografia em nível nanométrico têm uma maior influência na diferenciação de osteoblastos e adesão de proteínas quando comparada com outros níveis topográficos²⁵. No geral, osteoblastos respondem especificamente à superfícies nanoestruturadas através do aumento na expressão de marcadores da diferenciação celular e produção de fatores locais, aumentando assim a osteogênese guiada pelo material²⁶. Além disso, a criação de superfícies nanoestruturadas pode ser acompanhada pela alteração de sua composição química²⁷. Essa consequência da criação de nanoestruturas é um aspecto importante, uma vez que a manipulação da topografia por si só pode não ser o suficiente para induzir respostas celulares positivas, sendo necessário também o controle da composição química das superfícies²⁸. Dessa forma, uma tendência quanto ao desenvolvimento de implantes metálicos é a criação de superfícies nanoestruturadas em materiais previamente manipulados para apresentarem topografia com organização micrométrica. Esse processo possibilita a criação de materiais que exibem estrutura hierárquica, que aliada à presença de compostos bioativos poderão controlar precisamente a resposta biológica e a consequente osteointegração¹².

Osteoblastos não interagem diretamente com a superfície dos implantes, mas por meio de um mecanismo sensorial onde reconhece proteínas previamente adsorvidas a partir do fluido corpóreo na superfície do material através de receptores da membrana chamados integrinas²⁹. Integrinas são compostas por subunidades α e β unidas por ligação dissulfeto que podem ligar-se especificamente a proteínas no meio extracelular e dar início à cascatas de sinalização no interior das células²⁹. Superfícies rugosas influenciam na adsorção de proteínas, podendo então afetar a progressão do fenótipo dos osteoblastos através do aumento na expressão de integrinas, controlando então diretamente a diferenciação celular e produção de fatores locais²⁹.

Além da rugosidade, outro fator importante no controle da adsorção de proteínas e adesão celular é a molhabilidade das superfícies. A molhabilidade reflete a habilidade de um fluido em se espalhar sobre uma dada superfície, relacionada ao equilíbrio entre as diferentes forças que agem na interface líquido-sólido, além de também ser influenciada

pela topografia da superfície³⁰. Na ciência dos biomateriais, a molhabilidade é frequentemente determinada por medidas de ângulos de contato (θ) entre a gota de um líquido e a superfície em estudo³¹. Quando esse líquido é água, superfícies onde a gota de água tende a se espalhar espontaneamente ($\theta < 90^\circ$) são chamadas hidrofílicas. Se $\theta > 90^\circ$, a superfície é chamada hidrofóbica. Todavia, esse limite clássico entre hidrofobicidade e hidrofiliabilidade tem sido revisado devido à presença de moléculas de água estruturadas na interface sólido-líquido^{32,33}. O valor de θ é medido na interface sólido-líquido-gás e é fixo univocamente pela natureza química das diferentes fases e o equilíbrio de forças atuando entre elas. θ é correlacionado matematicamente pela equação de Young-Dupré³⁴, $\cos(\theta) = (\gamma_{SG} - \gamma_{SL})/\gamma_{LG}$, onde γ é a tensão interfacial entre as fases sólido (S), líquido (L) e gás (G), como representado na Figura 1.1. Em particular, γ_{SG} é chamada energia livre de superfície (ELS) de um sólido. ELS é um importante parâmetro uma vez que pode ser determinada usando modelos que não dependem apenas do valor total de γ_{SL} e γ_{LG} , mas também considera forças intermoleculares específicas. Então, a ELS total pode ser vista como uma combinação entre forças dispersivas (γ_{SG}^d) e polares (γ_{SG}^p)³⁴. A ELS de um biomaterial irá determinar como proteínas e membranas celulares irão interagir com as superfícies.

Figura 1.1: Representação esquemática do ângulo de contato definido entre a gota líquida e a superfície sólida.

Em aplicações biomédicas, o tipo e a forma com a qual uma proteína irá adsorver sobre a superfície é mais importante do que a quantidade total adsorvida. A substituição de proteínas inicialmente adsorvidas por outras com maior afinidade ou maior funcionalidade e a retenção da conformação nativa pela proteína adsorvida irão ditar a bioatividade do biomaterial³⁵. A camada de proteínas adsorvidas na superfície do implante irá determinar como células irão se aderir e espalhar sobre as superfícies, influenciando a posterior maturação das células. Arima et al.³⁶ mostraram que albumina pode bloquear a interação célula-implante ligando-se fortemente a superfícies

hidrofóbicas não permitindo então a reposição por outras proteínas da matriz extracelular, enquanto que em superfícies hidrofílicas esse processo de substituição é favorecido. Células podem aderir não-especificamente às superfícies através de interações iônicas e forças de van der Waals, ou aderir especificamente mediadas por proteínas previamente adsorvidas³⁷. Em osteoblastos, receptores do tipo integrinas reconhecem motivos como Arg-Gly-Asp (RGD) em proteínas adsorvidas, como a fibronectina e vitronectina, formando adesões focais com as superfícies. Isso ativa uma cascata de vias de sinalização intracelulares que afetam o comportamento celular³⁸. Em superfícies hidrofóbicas, osteoblastos fetais humanos expressam níveis significativamente mais baixos das integrinas $\alpha 5$ e $\beta 3$ em comparação com células cultivadas em superfícies hidrofílicas³⁹. Além disso, superfícies contendo grupos polares (COOH e NH_2) estimularam maior atividade das integrinas, que leva a maior adesão e espalhamento de células de fibroblastos⁴⁰. A molhabilidade das superfícies controla não apenas a interação com osteoblastos, como também com outros tipos de células. Hotchkiss et al.⁴¹ observaram que materiais com alta molhabilidade produziram um microambiente anti-inflamatório através da ativação de macrófagos e produção de citocinas. Isto indica que a manipulação da molhabilidade de biomateriais é crucial para estimular respostas positivas em aplicações biomédicas. Aliada à molhabilidade das superfícies, a carga elétrica é outro fator envolvido na evolução biológica de um tecido ao redor de um implante. Essa carga depende de vários fatores, como a composição química da superfície do material, a situação inflamatória, o pH do meio, entre outros fatores⁴². A carga superficial e a distribuição de cargas do biomaterial irão influenciar a adsorção de proteínas, a adesão de membranas celulares e a forma das células aderidas na superfície do material, sendo então fundamental para o controle da completa osteointegração do material implantado⁴²⁻⁴⁴.

A manipulação da topografia e molhabilidade de implantes é quase sempre acompanhada da alteração da composição química das superfícies. No geral, a modificação de superfícies metálicas tem sido empregada de modo a aumentar a afinidade por substâncias polares^{45, 46} e a criar superfícies bioativas que simulem a composição e a estrutura do tecido ósseo, por meio da deposição de fosfatos de cálcio⁴⁷⁻⁴⁹. Além disso, a alteração da química superficial pode ser feita por meio da imobilização de proteínas⁵⁰, peptídeos⁵¹, fatores de crescimento (TGF)⁵² com o intuito de gerar repostas celulares específicas entre o material implantado e o corpo hospedeiro. Um caso clássico é a

identificação da influência da sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp na adesão de proteínas (osteopontina, colágeno tipo I, fibronectina) que levou à imobilização de peptídeos contendo essa sequência sobre superfícies almejando melhorar a adesão celular^{51,53}.

Figura 1.2: Sequência de eventos que ocorrem na interface tecido-implante. Após a implantação do biomaterial, a sua superfície é condicionada pela adsorção de moléculas de água, íons e açúcares, dentre outras moléculas, que são provenientes do fluido corpóreo. Proteínas são então adsorvidas, e as características da superfície do material podem levar à desnaturação ou a manutenção da conformação nativa. A camada de proteínas adsorvidas é responsável por mediar a sequente adesão celular. Nesse processo de adesão, moléculas presentes na membrana das células (as integrinas) reconhecem sequencias peptídicas específicas (RGD, por exemplo) da camada de proteínas adsorvida sobre a material, desencadeando o sequente processo de adesão celular.

2. Uma visão simplificada da osteogênese

A osseointegração de um material implantado dá-se pelo sucesso no processo de osteogênese sobre a superfície do implante, culminando na formação de tecido ósseo fortemente ancorado ao material. Durante a formação e manutenção do tecido ósseo há a participação de quatro tipos de células: células osteogênicas, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Figura 1.3). Células osteogênicas, como as tronco mesenquimais, são células capazes de se diferenciarem em osteoblastos, que são as células formadoras da matriz mineralizada do tecido ósseo. Osteoclastos são células multinucleares responsáveis pela reabsorção da matriz mineralizada. Por fim, osteócitos são as células mais abundantes e com vida longa no tecido ósseo, originadas a partir da diferenciação de osteoblastos e são responsáveis pela manutenção do tecido ósseo. Apesar de aparentemente inerte, o osso é um órgão altamente dinâmico que está em constante processo de remodelagem devido à reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos e a formação de nova matriz mineralizada por osteoblastos. É necessário um balanço entre a atividade osteoclástica e a atividade osteoblástica de modo que ocorra formação de novo tecido ósseo e o desequilíbrio desse processo pode causar doenças, como a osteoporose.

Figura 1.3: Diferentes células presentes no tecido ósseo. Imagem adaptada da referência 54.

Osteoblastos são células cúbicas derivadas de células tronco mesenquimais com habilidade de sintetizar a matriz orgânica mineralizada. O comprometimento de células mesenquimais à diferenciação em osteoblastos requer a expressão de genes específicos responsáveis pela determinação do fenótipo osteoblástico, como o *Runx2*^{55,56}. Uma vez que a transcrição de *Runx2* é ativada nas células, elas são então chamadas de pré-osteoblastos. Essas células, então, passam por um processo de diferenciação em três etapas que culmina na formação de osteoblastos maduros. Essas etapas consistem em: (1) crescimento (proliferação) e biossíntese da matriz extracelular (MEC); (2) organização,

desenvolvimento e maturação da MEC e finalmente a (3) mineralização da MEC. Osteoblastos maduros podem sofrer apoptose ou partir para a diferenciação em osteócitos.

O metabolismo de osteoblastos pode ser acompanhado *in vitro* com o uso de culturas de células⁵⁷, sendo essa uma importante ferramenta para a avaliação da resposta biológica de biomateriais. O uso de culturas de osteoblastos em diferentes superfícies permite obter informações relacionadas à citotoxicidade, adesão, proliferação e diferenciação celular⁵⁸. Para culturas *in vitro*, células podem ser obtidas a partir de tecidos vivos (células primárias) ou podem ser utilizadas células de linhagem, que são imortalizadas para reproduzirem com reprodutibilidade o fenótipo celular de interesse. Durante os primeiros dias de cultura, há um período de ativa proliferação dos osteoblastos, refletida por sua alta atividade mitótica e expressão de diferentes genes relacionados com a formação da matriz extracelular. À medida que a fase de proliferação é cessada, é possível identificar diferentes proteínas associadas com o fenótipo osteoblástico, por exemplo, nessa etapa a enzima fosfatase alcalina (ALP) possui sua atividade aumentada consideravelmente. O fim da etapa de proliferação é marcado pela expressão de diferentes proteínas como a osteocalcina, as sialoproteínas do osso e o colágeno tipo I. Durante esse estágio de diferenciação dos osteoblastos, a MEC sofre uma série de modificações em estrutura e organização de modo a preparar o ambiente para a posterior etapa de mineralização. O início da mineralização é também marcado pela expressão de outras proteínas, como a osteopontina (OP) e a osteocalcina (OC) e proteoglicanos. Vale ainda ressaltar que durante a maturação dos osteoblastos ocorre a expressão de diferentes integrinas, proteínas especificamente ligadas ao processo de adesão dessas células à superfícies³⁸. O desenvolvimento dos osteoblastos pode ser esquematizado por uma sequência cronológica, com dois pontos de transição cronologicamente marcados (linhas tracejadas): o primeiro é o fim da etapa de proliferação, onde os genes responsáveis pelo crescimento celular são *down-regulados* pelo início da síntese e organização da MEC e o segundo é a mineralização da MEC.

Figura 1.4: Modelo para a relação cronológica entre a proliferação e a diferenciação de osteoblastos *in vitro*⁵⁹.

O resultado da ação dos osteoblastos é a formação da matriz mineralizada que compõe o tecido ósseo. O tecido ósseo chama a atenção por sua estrutura hierárquica em diferentes níveis de organização, onde o bloco construtor dessa complexa arquitetura a nível molecular são fibrilas de colágeno mineralizadas. Moléculas de colágeno são secretadas por osteoblastos e se auto-organizam em fibrilas que exibem um padrão característico de bandas ao longo dos seus eixos⁶⁰. Durante a fibrilogenese, moléculas de colágeno com aproximadamente 300 nm de comprimento são empacotadas em fibrilas que exibem um padrão de bandas de 67 nm, formadas por uma região densa de 27 nm (chamada de região de *overlap*, do inglês) e outra região menos densa de 40 nm (região de *gap*) (Figura 1.5 A-C). Essa matriz orgânica atua então como molde onde cristais de hidroxiapatita (HAp) depositam-se no interior e entre as fibrilas de colágeno. A mineralização do colágeno durante a formação do tecido ósseo tem sido especulada por ocorrer a partir de um transiente amorfo, que se infiltra eletrostaticamente nas zonas de *gap* das fibrilas de colágeno, transformando-se então em cristais de HAp no interior da fibrila⁶¹⁻⁶³ (Figura 1.5 D). Os cristais de HAp possuem uma estrutura única na forma de plaquetas, por volta de 2-6 nm em espessura, 30-50 nm de largura e 60-100 nm de comprimento⁶⁴, tamanho esse que não seria termodinamicamente estável na ausência da matriz orgânica. Os cristais apresentam-se orientados paralelamente ao longo da fibrila de colágeno. A morfologia de plaquetas da HAp no tecido ósseo determina suas propriedades mecânicas⁶⁵, todavia representa uma quebra da simetria hexagonal esperada

para os cristais de HAp e os mecanismos pelos quais essa morfologia é estabilizada ainda permanecem elusivos.

Figura 1.5: (adaptada da Referência 66): A) Esquema da tripla hélice formada pela molécula de colágeno. B) Modelo da formação do espaçamento d (67 nm) nas fibrilas de colágeno a partir da organização periódica das moléculas de colágeno. C) Imagem de AFM das fibrilas de colágeno mostrando o espaçamento de 67 nm. D) Esquema da organização dos cristais de HAp na estrutura do tecido ósseo, onde encontram-se infiltrados na zona de gap da fibrila de colágeno.

Apesar do fluido corpóreo ser supersaturado em relação às concentrações de Ca^{2+} e PO_4^{3-} necessárias para a precipitação de HAp, a sua formação durante a osteogênese ocorre apenas devido à ação orquestrada dos osteoblastos. Isso se deve ao fato de que íons PO_4^{3-} são armazenados na forma de pirofosfatos (PP_i) ou complexados com proteínas, atuando no fino controle da homeostase e inibição da mineralização patológica. Na osteogênese, essa barreira é quebrada pela ação dos osteoblastos, que liberam as chamadas vesículas da matriz (VM) ao meio extracelular. VM são estruturas extracelulares (100 a 300 nm de diâmetro) formadas por uma membrana lipídica na qual encontra-se alojado o maquinário bioquímico (enzimas e proteínas de transportes) necessário para o acúmulo de íons e controle da nucleação e crescimento de HAp durante a biomineralização óssea⁶⁷⁻⁶⁹. As VM são compostas por proteínas e lipídeos que mediam as interações com a matriz extracelular e controlam o processo de deposição da fase mineral. Um exemplo muito estudado é a enzima fosfatase alcalina (TNAP), presente na superfície externa das vesículas com habilidade de hidrolisar ésteres de fosfato (PP_i e ATP) a fosfato inorgânico (P_i ou PO_4^{3-})⁷⁰. Além da TNAP, outras fosfatases presentes na membrana das VM, como a pirofosfatase/fosfodiesterase (NPP1) atuam no controle da razão PP_i/P_i ⁶⁸⁻⁷¹, representando assim o gatilho da mineralização óssea. Além de enzimas, as VM possuem ainda diferentes proteínas transportadores que atuam no fluxo de íons Ca^{2+} e P_i através da membrana⁶⁸. Isso é importante uma vez que a nucleação dos cristais

de fosfato de cálcio que serão posteriormente liberados pelas VM se dá na membrana lipídica interna das VM. Dessa forma, íons PO_4^{3-} resultante da ação da TNAP são transportados para o interior das VM por meio do cotransportador sódio/fosfato do tipo III ($\text{P}_i\text{T}1$)⁷² e íons Ca^{2+} são transportados para o interior através da ação de proteínas transportadoras chamadas anexinas. O processo de mineralização mediado por VM é esquematizado na Figura 1.6.

Figura 1.6: Esquema do papel das VM na mineralização óssea. A estrutura lipídica das VM proporciona o ambiente necessário para a ação de enzimas responsáveis pela geração de íons PO_4^{3-} a partir de substratos presentes no meio extracelular. Proteínas como a AnxA5 e a $\text{P}_i\text{T}-1$ são responsáveis pelo transporte de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} para o interior da membrana, local onde o centro nucleador (CN) induz e controla a formação de fosfatos de cálcio que serão posteriormente expostos à matriz extracelular e fornecer meios para a mineralização das fibrilas de colágeno com cristais de HAp.

3. Biominaerais e métodos para sua deposição em superfícies

A obtenção de materiais bioativos que simulem a composição do tecido ósseo, por meio da deposição de fosfatos de cálcio é uma tendência na modificação de superfícies metálicas⁷³. Existem vários tipos de fosfatos de cálcio sendo que a formação de uma fase ou outra é determinada pelas condições do meio (pH, temperatura) e presença de impurezas. A HAp é o fosfato de cálcio mais estável e mais insolúvel em condições ambientes, cuja fórmula molecular é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e razão molar Ca/P é 1,67, sendo

o principal componente inorgânico de ossos e dentes de vertebrados. A solubilidade das apatitas em água é uma propriedade importante que pode ser usada para prever seu comportamento *in vivo*.

A HAp biológica contém uma variedade de íons traço (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} , F^- e Sr^{2+}) na sua rede cristalina, que afetam sua cristalinidade, solubilidade e biocompatibilidade. Íons carbonato (CO_3^{2-}) são os principais substituintes na estrutura da HAp, podendo estar presente no lugar do grupo $-OH$ (substituição do tipo A) ou do grupo fosfato PO_4^{3-} (substituição do tipo B), dependendo do processo de síntese. A HAp presente no tecido ósseo humano é carbonatada (substituição do tipo B) e de baixa cristalinidade⁶³.

A adição de biominais sobre superfícies metálicas na forma de um filme fino, acarreta em mudanças tanto da química superficial quanto da topografia. Diferentes métodos podem ser utilizados para o recobrimento de superfícies metálicas com fosfatos de cálcio: spray de plasma⁷⁴, sol-gel⁷⁵, deposição eletroforética⁷⁶ e método biomimético^{77,78}. A técnica de spray de plasma é a mais empregada para a formação de filmes finos de HAp, inclusive já utilizada em materiais comerciais⁷⁹. Todavia, apresenta as desvantagens de uso de alta temperatura e equipamentos caros, além de dificuldades na reprodutibilidade, adesão e homogeneidade do recobrimento⁷⁹. Outro método muito utilizado é o crescimento de HAp sobre metais por meio da exposição à solução que simula o pH e a composição iônica do fluido corpóreo, chamada SBF (do inglês *simulated body fluid*). Esse método biomimético desenvolvido na década de 90^{77,80} baseia-se no processo natural de biomineralização, possibilitando a precipitação de cristais de HAp semelhantes ao processo *in vivo*. Além disso, a exposição de materiais à solução SBF é um modo de atestar a sua bioatividade⁷³, uma vez que a formação *in vivo* de HAp sobre a superfície do material implantado é um requerimento para a completa ligação entre o implante e o osso. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* relatam o uso de recobrimentos de apatitas para a modificação de superfícies metálicas^{81,82}. Fosfatos de cálcio, em especial a HAp, são biocompatíveis, apresentam boas propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, além de baixa biodegradabilidade⁸³. Essas propriedades podem ser melhoradas significativamente aumentando o biomimetismo⁸⁴ dos materiais sintetizados, obtendo minerais com características nanoestruturais, morfológicas e químicas semelhantes às encontradas em sistemas biológicos naturais. Superfícies de implantes

recobertas com HAp tem a habilidade de ligar-se diretamente ao tecido ósseo sem a formação de tecido fibroso ao seu redor, facilitando a osteointegração⁸¹.

Nosso grupo tem aplicado uma metodologia biomimética para a deposição de fosfatos de cálcio sobre superfícies metálicas. Nesse método, utilizamos uma biomembrana lipídica depositada sobre a superfície metálica de modo a aumentar a supersaturação de Ca^{2+} na interface e promover o crescimento controlado da fase mineral através da imersão em soluções precursoras contendo Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Através da escolha do fosfolípido, é possível controlar a saturação de Ca^{2+} na interface, dando origem a filmes finos de HAp com diferentes morfologia e propriedades superficiais (rugosidade e molhabilidade)^{85,86}, como esquematizado na Figura 1.7. Essa metodologia é vantajosa devido ao uso de equipamento de custo relativamente baixo, e condições brandas de pH e temperatura. Além disso, permite a incorporação de biomoléculas no recobrimento, como colágeno tipo I⁸⁶, além de ser uma metodologia bioinspirada no processo de formação mineral do tecido ósseo, onde a precipitação de cristais de HAp é mediada por membranas lipídicas.

Figura 1.7: Filmes de fosfolípidos podem ser usados para aumentar a saturação de Ca^{2+} na superfície de metais, onde, por meio da imersão em soluções precursoras de fosfatos de cálcio, dá origem a filmes contínuos e homogêneos de HAp, cuja estrutura é dependente da composição lipídica da matriz orgânica. Imagens de MEV das superfícies modificadas por essa metodologia foram extraídas das referências 85 e 86.

Além dos fosfatos de cálcio, o carbonato de cálcio é também um importante biomaterial usado em reparo e substituição óssea⁸⁷⁻⁸⁹, mas pouco explorado para o recobrimento de superfícies metálicas. CaCO_3 é o biomineral mais conhecido e intrigante. Diversos organismos têm a capacidade de controlar polimorfismo, local de nucleação,

tamanho e forma das partículas, fase cristalográfica, estabilidade e montagem hierárquica desse simples biomineral^{90,91}. Os materiais resultantes da biomineralização do CaCO_3 têm propriedades microestruturais, ópticas e mecânicas excepcionais^{90,92,93}. O CaCO_3 possui uma variedade de polimorfos, entre os quais encontra-se três polimorfos anidros cristalinos: a calcita, a vaterita e a aragonita. A calcita e a aragonita são as formas mais comuns em amostras biológicas e geológicas. A calcita é o mineral carbonatado mais abundante e é mais estável termodinamicamente que a aragonita em condições ambiente. Todavia, ambas as formas são comuns devido ao raio do íon cálcio ser muito próximo ao valor limite para a transição entre a forma romboédrica da calcita e a forma ortorrômbica da aragonita. Apesar de ser raramente encontrada na natureza, a vaterita é um produto sintético comum em precipitações a partir de soluções e empregando altas temperaturas, uma vez que pode ser cineticamente favorecida em determinadas condições, tornando-se o polimorfo mais estável⁹⁴.

Materiais bem-sucedidos para reparo ósseo baseados em CaCO_3 têm sido reportados na literatura, todavia são baseados em fontes naturais, como corais e conchas, limitando a disponibilidade e a reprodutibilidade dos materiais obtidos^{87,95}. Materiais baseados em CaCO_3 apresentam a vantagem de serem reabsorvíveis, são biocompatíveis e osteocondutores, tanto na forma de calcita⁹⁶ como de aragonita⁹⁷. Apesar dessas notáveis propriedades, o desenvolvimento de recobrimentos para superfícies metálicas baseados em CaCO_3 tem sido pouco explorado. Wang et al.⁹⁸ descreveram uma alternativa interessante para a formação de recobrimentos baseados em madrepérola, uma fonte natural de CaCO_3 . Nesse método, superfícies metálicas foram implantadas na superfície da concha de moluscos e após um longo tempo faz com que se deposite naturalmente uma camada de madrepérola sobre a superfície do implante, através de um processo complexo, demorado e com baixa reprodutibilidade. Devido à dificuldade em se utilizar fontes naturais, o desenvolvimento de metodologias sintéticas mostra-se mais promissor. Filmes finos de CaCO_3 tem sido obtidos por deposição eletroforética⁹⁹ e por direta imersão em soluções precursoras¹⁰⁰, mas a obtenção de filmes homogêneos ao longo de toda a superfície ainda é uma dificuldade. Nosso grupo tem superado essa barreira com o uso de matrizes orgânicas depositadas sobre superfícies de modo a mediar o crescimento de filmes finos de CaCO_3 . Através da associação entre filmes Langmuir-Blodgett (LB) e polieletrólitos, Ramos et al.¹⁰¹ demonstraram que é possível formar filmes finos de CaCO_3 onde as partículas exibem morfologia e tamanhos controlados pela

estrutura da matriz orgânica. Cruz et al.¹⁰² demonstraram a formação de CaCO_3 mediado pela deposição de filmes LB sobre superfícies de Ti. Nesse estudo, filmes com alta homogeneidade e reprodutibilidade foram obtidos e demonstraram ser bioativos quanto à precipitação de HAp e não tóxicos quanto à viabilidade de osteoblastos cultivados *in vitro*. Além de filmes LB, filmes poliméricos podem ser usados, e a adequada escolha dos polímeros utilizados permite o controle da morfologia e do polimorfismo do filme fino de CaCO_3 ^{103,104}.

Além de carbonatos e fosfatos de cálcio, o uso de filmes LB para mediar o crescimento de recobrimentos bioativos traz a possibilidade de precipitação de outros minerais. Um exemplo é a mediação do crescimento de SrCO_3 e apatitas com substituições iônicas por Sr^{2+} . O uso de Sr^{2+} em sistemas osteoindutores tem despertado atenção nos últimos anos devido ao efeito positivo do Sr^{2+} no metabolismo ósseo, como será descrito a seguir.

4. Papel do Sr^{2+} no tecido ósseo

O tecido ósseo é formado durante o crescimento humano e é mantido durante a vida adulta por um processo contínuo de renovação da matriz, chamado remodelagem óssea. Durante o crescimento, a formação de nova matriz excede o processo de reabsorção, resultando em uma expansão do tecido ósseo, processo esse mantido em equilíbrio durante a vida adulta. Quando ocorre um desequilíbrio, especialmente durante a menopausa, surge então a osteoporose, caracterizada pela deterioração e perda de massa óssea, resultando em um tecido frágil e com alto índice de fraturas¹⁰⁵. Várias terapias têm sido desenvolvidas para o tratamento da osteoporose, baseadas na inibição do processo de reabsorção (biofosfonatos e anticorpos monoclonais específicos) ou na estimulação anabólica do crescimento ósseo (hormônio paratiróide), todavia com dificuldades relacionada ao uso clínico e alto custo dessas moléculas, além do fato de atuarem em apenas uma causa da doença¹⁰⁶. Nesse sentido, terapias baseadas na inibição da reabsorção e promoção simultânea do crescimento ósseo têm-se mostrado mais eficazes. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* relatam que os íons Sr^{2+} apresentam esse duplo efeito^{107–109}. O fármaco ranelato de estrôncio (RSr), mostrado na Figura 1.8, um ligante carboxílico bidentado contendo dois íons Sr^{2+} , surgiu como um importante tratamento da osteoporose, por meio da ativação de diversas respostas bioquímicas em osteoblastos e

osteoclastos^{110–113}. Esses diferentes mecanismos farmacológicos mostraram beneficiar a qualidade e a resistência óssea em animais modelo e pacientes osteoporóticos. A ingestão de Sr^{2+} mostrou evidências farmacológicas na redução da diferenciação e atividade de osteoclastos e na reabsorção óssea *in vitro*¹¹⁴. Outro efeito do Sr^{2+} é o aumento da diferenciação de osteoblastos⁸². Em estudos de culturas de células precursoras de osteoblastos e de osteoblastos maduros, o RSr aumentou a atividade da fosfatase alcalina, uma enzima marcadora da diferenciação de osteoblastos, além de aumentar a síntese de colágeno, um indício da funcionalidade de osteoblastos¹¹⁴.

Figura 1.8: Estrutura química do RSr.

Marie¹¹⁵ relatou a importância da correta dosagem de Sr^{2+} para produzir uma resposta efetiva no osso *in vivo*. Enquanto baixas doses de Sr^{2+} estimulam a formação de tecido ósseo, altas doses podem levar a efeitos negativos na mineralização óssea, por meio da redução na absorção de Ca^{2+} e alteração nas propriedades dos minerais ósseos¹¹². A biodisponibilidade do Sr^{2+} administrado oralmente é relatada como apenas 20 %, de modo que a liberação controlada de íons Sr^{2+} diretamente no local do defeito ósseo é interessante para o aumento da concentração local de estrôncio. Dessa forma, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos para a incorporação de Sr^{2+} em biominerais^{116–118} e cerâmicas¹¹⁹, em vidros bioativos¹⁰⁷, óxidos metálicos^{120,121} e na síntese de nanotubos^{122,123} de Sr-Ti em superfícies de implantes, de modo promover a liberação controlada e local de íons Sr^{2+} . A presença de Sr^{2+} na interface tecido-implante é promissora para a obtenção de biomateriais que exibam rápida osteointegração. Atenção especial tem sido dada aos enxertos ósseos baseados em fosfatos de cálcio, que podem ser integrados durante o processo de remodelagem óssea devido a sua solubilidade e biodegradabilidade, sendo então ideais para a liberação controlada local de Sr^{2+} ^{118,124}. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a síntese de HAp substituídas com Sr^{2+} , como por precipitação^{117,125}, spray de plasma¹²⁶, sol-gel¹¹⁶ e método biomimético^{127,128}. Sr^{2+} pode ser um substituinte em fosfatos de cálcio devido à sua similaridade química com íons Ca^{2+} . No caso da HAp, essa substituição causa expansão da rede cristalina¹²⁹. Estudos *in vitro* indicaram que

apatitas substituídas com Sr^{2+} aumentaram a proliferação e a diferenciação de osteoblastos^{130,131}. Quando implantados, esses biomateriais indicaram também boa osteointegração por meio do estímulo da formação de novo tecido ósseo¹³². Devido às dificuldades encontradas na resistência mecânica de enxertos ósseos baseados em Sr-HAp, esses biominerais têm sido também utilizados para o recobrimento de superfícies metálicas^{116,126,127}. Poucos estudos relatam o uso do SrCO_3 como fonte para a liberação de íons Sr^{133} em biomateriais e a imobilização de RSr em superfícies metálicas para a produção de sistemas de liberação controlada¹³⁴. Recentemente, Ai Tian et al.¹³⁴ estudaram a modificação de superfícies de Ti com RSr imobilizado em um filme de quitosana, promovendo a proliferação e o crescimento de osteoblastos de modo dependente à quantidade de fármaco liberada.

5. Monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett

Uma metodologia que se mostra promissora para o desenvolvimento de recobrimentos para superfícies metálicas contendo Sr^{2+} são os filmes Langmuir-Blodgett (LB). Essa metodologia consiste na criação de filmes finos molecularmente organizados baseados em moléculas anfifílicas. Moléculas anfifílicas são aquelas que possuem regiões polares e apolares bem definidas em sua estrutura. Quando essas moléculas (na forma líquida, em solução ou cristal) são colocadas em uma superfície aquosa elas se espalham espontaneamente na interface líquido-ar, adsorvendo-se de maneira orientada, de forma que sua parte polar fique em contato com a água e sua parte apolar fique em contato com o ar, formando uma camada monomolecular na interface. A formação de monocamadas de tensoativos insolúveis na interface líquido-ar pode ser estudada por meio da técnica desenvolvida na década de 1910 por Irving Langmuir (1881- 1957)¹³⁵. Em 1920, Langmuir foi premiado com o prêmio Nobel pelo estudo desses filmes monomoleculares. Os filmes são formados pelo espalhamento de uma pequena quantidade de solução da molécula anfifílica sobre a superfície de uma subfase contida em um recipiente revestido internamente com um material inerte (geralmente Teflon), conhecido como cuba de Langmuir (Figura 1.9).

Figura 1.9: Esquema da Cuba de Langmuir

A Cuba de Langmuir possui uma ou duas barreiras móveis que se movimentam reduzindo a área ocupada por molécula, organizando-as na interface. A adsorção das moléculas anfifílicas na interface líquido-ar da subfase aquosa com tensão superficial γ_0 provoca redução da tensão superficial (γ). A diferença entre a tensão superficial sem e com a monocamada define a pressão de superfície (π):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

Sabendo o quanto de tensoativo foi espalhado em uma determinada área, podemos determinar a área disponível por molécula. Dessa forma, à temperatura constante, à medida que a barreira móvel comprime a monocamada é possível determinar a variação de π em função da área ocupada por molécula, resultando na isoterma de pressão de superfície. A compressão da monocamada leva a diferentes estados físicos bidimensionais que podem ser identificados na isoterma de pressão de superfície (Figura 1.10). Os diferentes graus de empacotamento da monocamada são nomeados em analogia aos estados tridimensionais da matéria (gás, líquido e sólido). A isoterma $\pi - A$ de uma monocamada é conceitualmente semelhante às isotermas pressão x volume da termodinâmica clássica. A estrutura de uma monocamada é estabilizada por meio de interações laterais atrativas entre grupos alquila-alquila, interações atrativas entre cabeças polares e subfase e interações repulsivas entre as cabeças polares. As interações entre grupos alquila-alquila surgem das forças de van der Waals, cuja magnitude aumenta com o aumento da cadeia carbônica e diminui com a distância entre as moléculas. Filmes estáveis são formados quando as interações atrativas são mais intensas que as repulsivas.

Figura 1.10: Esquema de uma isoterma típica π versus A para moléculas anfifílicas espalhadas na interface líquido-ar. À medida que ocorre a redução da área ocupada por molécula de tensoativo através do movimento da barreira da cuba, a monocamada atinge diferentes estados de compactação: gasoso (G), líquido-expandido (LE), líquido-condensado (LC) e sólido (S).

O primeiro estado de organização de uma monocamada é o estado gasoso (G). À baixas pressões superficiais, o filme consiste de moléculas suficientemente separadas uma das outras tais que as forças de atração laterais são negligenciáveis. As moléculas possuem uma energia cinética média de $\frac{1}{2}k_B T$ para cada grau de liberdade, onde k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. A pressão de superfície medida é então igual às colisões entre as moléculas anfifílicas e a flutuação das moléculas na superfície devido aos dois graus de liberdade translacionais em duas dimensões. À medida que a área ocupada por molécula é diminuída, é atingido o próximo estado de compactação da monocamada, a fase líquida. A fase líquido-expandida (LE) é usualmente formada por moléculas que possuem algum tipo de impedimento para a compactação ou com interações cadeia-cadeia relativamente fracas (cadeias ramificadas ou curtas, altas temperaturas), formando um filme altamente elástico, onde as cadeias das moléculas estão desordenadas, como em um líquido. Com a diminuição da distância entre as moléculas ocorre a transição para a fase líquido-condensado (LC). A estrutura dessa fase é controversa, mas acredita-se que as moléculas podem estar organizadas tal que suas cadeias estejam de alguma forma desordenadas (tipo um líquido) ou que as moléculas estejam com suas cadeias completamente estendidas, mas dispostas angularmente à vertical. A fase sólida (S) é caracterizada por uma região bastante linear na isoterma $\pi - A$, indicando baixa compressibilidade da monocamada. Os filmes sólidos são observados em sistemas onde as moléculas aderem-se fortemente uma às outras por meio de

interações de van der Waals. Continuando a compressão da monocamada atinge-se uma situação de máximo empacotamento e as moléculas são desestruturadas para fora da superfície, caracterizando o colapso da monocamada.

Por meio da análise do formato da isoterma π - A, podemos identificar transições entre as diferentes fases. Transições de primeira ordem entre as fases G e LE ou LC aparecem em regiões de π constante, embora na prática os valores de π são muito baixos para serem mensurados com precisão. Em contrapartida, transições entre LE e LC e de LE para S geralmente mostram mudança apreciável de π durante a compressão da monocamada. A coexistência de dois estados durante uma transição indica que ela é de primeira ordem, mesmo que π não permaneça constante. O valor de π em que uma transição de primeira ordem ocorre é dependente do tipo de molécula, do comprimento da cadeia carbônica em uma série homóloga e da temperatura. Transições de segunda ordem ocorrem com uma mudança abrupta da π . O caso principal é a transição de LC para S, onde a dependência da temperatura torna-se mais complexa devido a mudança abrupta na natureza dos estados envolvidos.

Monocamadas de fosfolípidos em subfases aquosas são um importante sistema biomimético para investigar a estrutura e as propriedades de membranas e processos biológicos¹³⁶. Dessa forma, é possível simular membranas biológicas¹³⁷ e estudar efeitos de íons^{138,139}, proteínas¹⁴⁰ e fármacos¹⁴¹ na estrutura e propriedades das monocamadas apropriadas, correlacionando-os com fenômenos biológicos. Em especial, monocamadas de Langmuir são uma importante ferramenta no estudo da influência da matriz orgânica na biomineralização^{85,102,142,143}. A origem dessa aplicação está na ideia de que a nucleação da fase mineral em sistemas biológicos dá-se pela correspondência estrutural entre grupos funcionais da matriz orgânica e a estrutura cristalina dos núcleos minerais em formação¹⁴⁴. Dessa forma, as monocamadas de Langmuir proporcionam uma interface com alta organização estrutural a nível molecular, possibilitando estudar o efeito da matriz orgânica na nucleação e crescimento da fase mineral.

Uma vez em que a monocamada se encontra no estado condensado, a imersão ou emersão vertical de suportes sólidos através dela origina os filmes LB. Nesse caso, cada etapa de imersão ou emersão do suporte através da interface permite a deposição de uma monocamada em cada lado do suporte. O suporte sólido é imerso na água, quebrando o filme de Langmuir, que se fixa ao substrato, cobrindo-o com uma camada monomolecular. Uma vez que a primeira camada foi depositada, as camadas seguintes se

depositam em cada passagem subsequente do substrato pela interface ar-água. Multicamadas podem, portanto, ser depositadas para produzir um filme, cuja espessura é o produto do comprimento da cadeia molecular individual e o número de vezes que o substrato cruzou a interface ar-água. Dessa forma, a espessura e a orientação de cada monocamada do filme no suporte são controladas pelo número de ciclos (subida e descida) do motor e pela sequência em que é realizada a deposição. Quanto à morfologia dos filmes, eles podem ser do tipo Y, X ou Z. O tipo Y é o mais comum por conta da sua maior estabilidade em relação aos demais. Para a obtenção deste filme a deposição é conduzida por etapas de emersão e imersão, respectivamente, do suporte pela monocamada. O tipo X pode ser obtido por etapas de imersão e o tipo Z por etapas de emersão. Vale ressaltar que a estrutura dos filmes X e Z refere ao modo de deposição do filme, uma vez que os filmes resultantes podem se reorganizar e gerar estruturas semelhantes às do filme tipo Y.

Figura 1.11: Esquema da transferência das monocamadas para um suporte sólido formando os filmes LB com distintas morfologias..

CAPÍTULO 2

*Crescimento de filmes híbridos contendo
CaCO₃ e/ou SrCO₃ sobre superfícies de Ti mediado por
filmes Langmuir-Blodgett*

1. Introdução

O mecanismo pelo qual a natureza produz uma variedade de tecidos mineralizados rebuscados e altamente funcionais a partir de sais inorgânicos simples é denominado biomineralização. Esse processo ocorre em microambientes específicos, à temperatura ambiente e em meios aquosos, dando origem a materiais avançados, complexos, com alta organização hierárquica, e controle de tamanho, forma e polimorfismo^{145,146}. A formação de minerais em sistemas biológicos é guiada por uma matriz de moléculas orgânicas^{147,148}. Por exemplo, o equilíbrio entre polimorfos e a direção do crescimento do CaCO_3 em organismos vivos sugerem que a mineralização seja controlada por polímeros e macromoléculas orgânicas^{94,149}. Inspirados por essa propriedade intrigante das matrizes orgânicas em controlar a nucleação e o crescimento de biominerais, nosso grupo tem se especializado no desenvolvimento de recobrimentos bioativos para superfícies metálicas através do crescimento controlado de biominerais mediado por filmes LB. Filmes finos com alto grau de organização estrutural têm sido formados por essa técnica contendo fosfatos^{85,142} e carbonatos de cálcio^{102,143}. Cruz et al.¹⁰² desenvolveram filmes finos contínuos e homogêneos de CaCO_3 sobre superfícies de Ti, que mostraram otimizar as propriedades superficiais do Ti e não serem tóxicos a osteoblastos cultivados *in vitro*. Uma vez que o ponto chave do crescimento de biominerais mediado por filmes LB é a interação entre cátions e a cabeça polar dos lipídeos, essa metodologia pode ser utilizada para a cristalização de diferentes minerais, como o SrCO_3 . Dessa forma, nesse capítulo descreveremos a formação de filmes híbridos contendo CaCO_3 e SrCO_3 . A composição dos filmes foi avaliada em relação às suas propriedades superficiais. A bioatividade dos filmes híbridos foi avaliada através da exposição à solução SBF, caracterizando quanto à habilidade em formar hidroxiapatita sobre as superfícies modificadas. Por fim, avaliou-se a resposta biológica dos filmes híbridos formados sobre superfícies de Ti através de cultura *in vitro* de osteoblastos.

2. Parte Experimental

2.1. Formação dos filmes híbridos

2.1.1. Pré-tratamento das Superfícies

Discos de Ti (REALUM, Brasil, grau 2, 13 mm de diâmetro) foram limpos sob banho ultrassom em solução aquosa de detergente comercial, álcool etílico PA e acetona PA, 15 min em cada solvente. Antes da deposição dos filmes LB, os discos foram tratados utilizando-se solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 7,5) contendo o surfactante não-iônico, Span 20 ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), durante 5 min a 65°C sob banho ultrassom.

2.1.2. Estudo das monocamadas de Langmuir na interface líquido-ar

Foram obtidas isotermas π -A para o ácido octadecilfosfônico (OPA, Sigma-97%, $334,47 \text{ g.mol}^{-1}$) em diferentes subfases contendo água deionizada (tensão superficial $72,3 \text{ mN m}^{-1}$ e condutividade $1,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C), solução aquosa $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CaCl_2 , SrCl_2 ou mistura $\text{CaCl}_2:\text{SrCl}_2$ (1:1, n/n), a 25°C em uma Cuba de Langmuir (Insight, Brasil, 216 cm^2) após o espalhamento de solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do lipídeo solubilizado em mistura clorofórmio:metanol (3:1, v/v). A velocidade de compressão das monocamadas foi de $0,42 \text{ mm s}^{-1}$.

2.1.3. Modificação das Superfícies Metálicas por filmes LB

A deposição dos filmes LB sobre as superfícies de Ti foi realizada por meio da imersão e emersão dos discos através da monocamada de OPA em subfases contendo solução aquosa $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CaCl_2 , SrCl_2 ou mistura $\text{CaCl}_2:\text{SrCl}_2$ (1:1, n/n), a 25°C . As deposições foram realizadas usando um *dip-coater*, e a velocidade de imersão e emersão dos suportes foi $0,038 \text{ mm s}^{-1}$, mantendo π constante a 30 mN.m^{-1} . Foram formados filmes hidrofílicos, tipo Y, contendo 4 camadas lipídicas, de tal modo que a última camada dos filmes terminasse com a parte polar dos lipídeos exposta. A superfície de Ti assim modificada foi mantida em solução do mesmo cátion contido na subfase com concentração $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, de modo a evitar-se *flip-flop* do filme e saturar a superfície com o cátion. Os discos de Ti modificados com o filme LB foram expostos a atmosfera de CO_2 (g) obtida pela decomposição de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Vetec) em recipiente fechado, para a formação do mineral, durante 12 h.

2.1.4. Avaliação *in vitro* da bioatividade

Com o intuito de avaliar a bioatividade e promover o crescimento biomimético de HAp, as superfícies de Ti modificadas com filmes híbridos LB foram expostas a solução SBF a 37°C por 48 h, preparada de acordo com o método descrito na literatura⁷³. Essa solução simula o contato inicial de um material implantável com o fluido corpóreo e é um método muito utilizado em estudos de bioatividade: materiais que induzam a formação de HAp após contato com esta solução são reconhecidamente bioativos⁷³.

2.1.5. Análise da morfologia dos filmes híbridos

A morfologia dos filmes híbridos foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando um microscópio JEOL JSM-6610LV (FMRP-USP). As amostras foram previamente recobertas com um filme fino de ouro (pulverização catódica) em um equipamento Bal-Tec, SCD-050 Sputter Coater (DQ/FFCLRP).

2.1.6. Caracterização da composição química e estrutural

A análise dos grupos químicos presentes na superfície de Ti modificada com o filme LB e após o crescimento dos biominerais foi feita a partir da espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), com o acessório de reflexão total atenuada na superfície (ATR) por meio do espectrofotômetro Shimadzu Prestige (Laboratório de Terras Raras- DQ/FFCLRP).

A cristalinidade dos filmes híbridos foi analisada por difração de raios-X (DRX), (difratômetro Bruker-AXS D5005 - DQ/FFCLRP), com ângulo rasante, tendo como fonte tubo selado de Cu (2,2 kW) com um filtro monocromador de níquel cuja radiação gerada possui $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. Padrões de difração das fases cristalinas em estudo foram obtidos usando o banco de dados American Mineralogist Crystal Structure Database (AMCSD)¹⁵⁰.

A quantificação de Sr e Ca foi obtida pela técnica de espectrometria de raios-X por dispersão de energia (EDX) em um equipamento IXRF system 500 Digital Processing acoplado ao microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss EVO 50 (DQ-FFCLRP).

2.1.7. Molhabilidade e energia livre de superfície

Medidas de ângulo de contato (θ) para as superfícies de Ti antes e após as modificações foram obtidas com o equipamento Dataphysics Contact Angle System OCA 20 (DQ/FFCLRP). Este equipamento possui uma câmera CCD que coleta imagens da gota depositada sobre a superfície de interesse. Essas imagens são tratadas por um software que automaticamente extrai a tangente e o ângulo formado entre a gota e a superfície, em intervalos de tempo pré-determinados. A energia livre de superfície (γ_{SV}) foi calculada a partir dos valores de θ entre líquidos de diferentes polaridades e a superfície sólida, utilizando a equação de Owens-Wendt^{151,152}, que divide a energia superficial total em suas componentes dispersivas (d) e polares (p).

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

Para cada líquido com γ_{LV} e suas componentes dispersivas (γ_{LV}^d) e polares (γ_{LV}^p) conhecidas, mede-se o valor de θ entre o líquido e a amostra. A γ_s é dada pelo soma de suas componentes polar (γ_{SV}^p) e dispersiva (γ_{SV}^d). Portanto, utilizando-se líquidos com diferentes polaridades é possível resolver algebricamente e encontrar o valor da energia superficial. Medidas de θ foram obtidas para os líquidos: água deionizada, diiodometano (Sigma-Aldrich, PA) e formamida (J. T. Baker, PA).

2.2. Cultura *in vitro* de osteoblastos

Todos experimentos envolvendo cultura celular foram realizados em colaboração com o Laboratório de Sistemas Biomiméticos de Membrana (DQ/FFCLRP), sob supervisão do Prof. Pietro Ciancaglini.

2.2.1. Isolamento e cultura de células mesenquimais de medula óssea de ratos

Células tronco mesenquimais foram extraídas da medula óssea do fêmur de ratos machos da linhagem Wistar, cultivadas e diferenciadas em osteoblastos de acordo com o procedimento descrito por Maniopoulos et al.¹⁵³ e com modificações descritas por Faria et al.¹⁵⁴. β -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona são responsáveis pelo processo de diferenciação celular. O procedimento de extração das células foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo 011/2014-1).

2.2.2. Viabilidade celular

A viabilidade de osteoblastos cultivados sobre as superfícies de Ti após as modificações foi avaliada pelo método clássico do MTT, descrito por Mosmann¹⁵⁵ e adaptado por de Faria et al.¹⁵⁴. Para isso, 1,0 mL de meio de cultura (α -men) contendo 2×10^4 células foi adicionado em cada poço de uma placa com 24 poços contendo um disco de Ti em cada. Nesse método, o sal MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] produz o composto altamente colorido formazan devido a redução do NADH presente nas células, refletindo assim a atividade da enzima desidrogenase em células vivas. Após a reação de coloração, a absorbância de cada poço foi mensurada a 560 e 690 nm usando o espectrofotômetro Spectronic (Genesys 2). Osteoblastos foram cultivados por 7, 14 e 21 dias sobre os discos de Ti modificados ou não. Resultados foram expressos como média de triplicata para cada amostra e expressos em comparação com o controle de poliestireno (100%).

2.2.3. Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

ALP é uma enzima não-específica e sua atividade enzimática foi determinada pela reação com o substrato p-nitrofenilfosfato (PNPP). A atividade da p-nitrofenilfosfatase (PNPPase) foi determinada descontinuamente a 37°C no sobrenadante gerado pelo tratamento da suspensão de células homogeneizadas com fosfolipase C (PIPLC) e ultracentrifugadas a 100 000 g. A atividade foi medida através da formação do íon p-nitrofenolato (PNP^-) ($\epsilon = 17,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH 13), a 410 nm, em $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de tampão 2-amino-2-metil-1-propanol (pH = 10) contendo $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de MgCl_2 e $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de PNPP, com volume final de 1,0 mL, de acordo com o protocolo descrito por Camolezi et al.¹⁵⁶. Os ensaios foram realizados em triplicata após 7, 14 e 21 dias de cultura. Foram realizados ensaios controle sem a adição de enzima para determinar a hidrólise não-enzimática do substrato. Os resultados foram expressos em unidade enzimática (1 U) definida como a quantidade de enzima hidrolisando 1,0 nmol de substrato por minuto, a 37°C, por mL de proteína.

2.2.4. Quantificação de nódulos de mineralização

Para a quantificação dos nódulos de mineralização formados *in vitro* sobre as superfícies de Ti após 14 e 21 dias de cultura foi utilizado o método de coloração pelo vermelho de alizarina, descrito por Gregory et al.¹⁵⁷. Nessa metodologia, os nódulos são fixados com formalina (10%) a 37°C, por 24 horas. Em seguida, são desidratados por um gradiente de concentração de etanol e secos por completo à temperatura ambiente. Então adiciona-se o corante vermelho de alizarina (2%) para a coloração dos nódulos ricos em Ca^{2+} . Após completa lavagem para retirada do corante não-ligado, os nódulos são solubilizados com solução de ácido acético. A solução resultante é então neutralizada com solução de NaOH e a absorbância registrada em 405 nm.

2.2.5. Análise da morfologia dos osteoblastos

Foi utilizada microscopia de fluorescência confocal (microscópio Leica TCS SP5-FMRP/USP) para avaliar a morfologia dos osteoblastos aderidos sobre as superfícies após 14 dias de cultura. As células foram coradas com laranja de acridina, um fluoróforo que se liga aos ácidos nucleicos, permitindo a obtenção de uma imagem em contraste (RNA em vermelho e DNA em verde). Para a visualização do DNA as amostras foram excitadas usando um feixe de 488 nm de um laser de Ar, sendo a emissão coletada entre 499 e 541 nm. Para a visualização do RNA as amostras foram excitadas a 458 nm e a emissão coletada entre 642 e 682 nm¹⁵⁸.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização físico-química dos filmes híbridos

A Figura 2.1-A mostra a estrutura química e as isotermas π -A de OPA, em subfase contendo água pura ou solução aquosa contendo Ca^{2+} e/ou Sr^{2+} . A monocamada do OPA em água pura apresenta área mínima de $26,0 \text{ \AA}^2$ por molécula, em concordância com resultados descritos na literatura^{159,160}. A área mínima ocupada por molécula na monocamada é calculada a partir da tangente extraída à isoterma no estado condensado. Em subfases contendo as soluções salinas, ocorre diminuição da área mínima ocupada por molécula de OPA, sendo de $24,2 \text{ \AA}^2$ em presença de Ca^{2+} ; $24,6 \text{ \AA}^2$ para o Sr^{2+} e $23,0 \text{ \AA}^2$ para a mistura $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$. Esse efeito de condensação da monocamada é causado pela presença dos cátions na subfase, que interagem com o grupo fosfato negativamente carregado do OPA, diminuindo a repulsão eletrostática entre as cabeças polares e permitindo maior empacotamento da monocamada⁸⁶. Apesar do erro inerente à técnica, observa-se que a maior compressão da monocamada de OPA ocorreu na presença da mistura $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$, o que pode ser explicado pelo equilíbrio sinérgico dos diferentes tipos de interações entre os cátions Ca^{2+} e Sr^{2+} e a cabeça polar do OPA. A diferença nos tipos de interação entre os cátions e o grupo fosfato pode ser atribuída aos diferentes graus de covalência e também a fatores geométricos¹⁶¹.

Figura 2.1: (A) Isotermas π versus A em subfases contendo água pura (■), solução aquosa de CaCl_2 (●), SrCl_2 (▼) ou $\text{CaCl}_2/\text{SrCl}_2$ (▲) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A estrutura química da molécula de OPA é mostrada na figura. (B) C_s^{-1} versus A nas diferentes subfases.

A elasticidade das monocamadas foi avaliada por meio da diferenciação das isotermas π -A (Figura 2.1-B), calculando-se então o módulo compressional (C_s^{-1}) das monocamadas em diferentes estágios de empacotamento das moléculas. A compressibilidade isotérmica para uma monocamada a qualquer área A é definida como

$$C_s = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi} \right)_T$$

Esse parâmetro pode ser calculado diretamente a partir da inclinação da curva π -A. Todavia, é mais conveniente utilizar o recíproco da compressibilidade na discussão de monocamadas. C_s^{-1} é chamado de módulo compressional e tem dimensão de mN/m, podendo ser correlacionado aos diferentes estados de compactação das monocamadas¹⁶², como mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Valores típicos de C_s^{-1} para diferentes estados da monocamada

Monocamada	C_s^{-1} (mN/m)
Sem surfactante	0
Líquido-expandida	12,5 a 50
Líquido-condensada	100 a 250
Sólida	1000 a 2000

As curvas de C_s^{-1} versus A obtidas para as monocamadas de OPA são mostradas na Figura 2.1-B. Como observado, a presença dos íons na subfase muda drasticamente os valores de C_s^{-1} , indicando que houve mudança nas propriedades reológicas da monocamada. Enquanto a presença de íons Ca^{2+} aumenta o valor do C_s^{-1} , a presença de Sr^{2+} provoca considerável decréscimo do valor de C_s^{-1} , como mostrado na Figura 2.1-B. Esse aumento da rigidez da monocamada na presença de Ca^{2+} pode ser associado à habilidade desse cátion ligar-se fortemente a grupos polares carregados negativamente¹⁶³. A influência da covalência na ligação entre íons e cabeças polares na organização de moléculas lipídicas em monocamadas de Langmuir é relatada na literatura^{163,165}. Além disso, o tipo de cátion presente na monocamada pode afetar a estruturação de moléculas de água na interface, o que também afetará a elasticidade da monocamada. Deamer et al.¹⁶¹ descreveram diferentes interações entre Ca^{2+} e Sr^{2+} e grupos carboxilatos em monocamadas de ácido esteárico, resultando em monocamadas com diferentes estruturas, especialmente relacionadas ao grau de hidratação dos cátions.

A presença dos diferentes cátions na subfase influenciou a estabilidade das monocamadas com $\pi_{\text{inicial}} = 30 \text{ mN/m}$, como mostrado na Figura 2.2 e Tabela 2.2 (valores de $\Delta\pi = \pi_{\text{inicial}} - \pi_{\text{final}}$). No caso da presença de Ca^{2+} , observa-se considerável redução de π , indicando que a alta rigidez da monocamada devida à forte ligação Ca^{2+} -cabeça polar favoreceu a desorganização da monocamada. Por outro lado, a presença de Sr^{2+} estabiliza a monocamada ao longo dos 30 minutos. Observa-se comportamento intermediário no caso da mistura $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$.

Figura 2.2: Curvas de estabilidade das monocamadas de OPA ($\pi_{\text{inicial}} = 30 \text{ mN/m}$) ao longo do tempo (min) em diferentes subfases.

Tabela 2.2: Valor máximo de C_s^{-1} para as monocamadas de OPA em diferentes subfases e o respectivo $\Delta\pi = \pi_{\text{inicial}} - \pi_{\text{final}}$ observado no experimento de estabilidade, ao longo de 30 min

Subfase	Máximo C_s^{-1} (mN/m)	$\Delta\pi$ (mN/m)
Água pura	608	-9,4
CaCl_2 1,0 mmol/L	1012	-21,7
SrCl_2 1,0 mmol/L	470	-1,7
$\text{CaCl}_2/\text{SrCl}_2$ 1,0 mmol/L	975	-9,3

Independentemente do tipo de interação entre os cátions e a cabeça polar do OPA, nota-se que é possível obter uma matriz orgânica molecularmente organizada que pode atuar como molde para a nucleação e o crescimento de minerais. A exposição das superfícies de Ti previamente modificadas com o filme LB contendo diferentes cátions a atmosfera de CO_2 (g) leva à precipitação de um filme contínuo e particulado, homogeneamente distribuído ao longo da superfície, cuja morfologia é dependente do

tipo de cátion que origina a fase mineral, como mostrado na Figura 2.3. Como será mostrado posteriormente, ocorre a formação do carbonato respectivo ao cátion presente no filme LB. No caso da matriz mineral obtida a partir do filme $(\text{OPA})_4\text{-Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$, onde Sr e Ca estavam presentes na proporção de 1:1 em mol para a construção do filme LB, a obtenção de espectros de EDX (Figura 2.3-E), indica a incorporação de Ca:Sr no filme híbrido seguindo a composição atômica (em %) de $(54,7 \pm 5,4):(45,3 \pm 4,7)$.

Figura 2.3: Imagens de MEV da superfície de Ti sem modificação (A) e após a formação dos filmes híbridos devido à exposição das matrizes LB contendo diferentes cátions B) Ca^{2+} ; C) Sr^{2+} e D) $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ à atmosfera de $\text{CO}_{2(g)}$ para a formação dos minerais. E) Espectro de EDX mostrando a presença de Sr e Ca no filme híbrido obtido a partir da mistura de $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ e imagem de MEV mostrando habito cristalino característico de aragonita/estroncianita presente nesse filme.

Os grupos químicos presentes nas superfícies de Ti após a formação dos filmes híbridos foram identificados por FTIR. Como observado na Figura 2.4, a exposição das superfícies de Ti modificadas com o filme LB contendo Ca^{2+} e ou Sr^{2+} leva à formação do respectivo carbonato, atestado pela presença das bandas intensas em $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ (ν_3 (CO_3^{2-} , estiramento C-O)¹⁶⁶ e $\sim 860 \text{ cm}^{-1}$ (CO_3^{2-} , ν_2)¹⁶⁷. É possível identificar bandas na região $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ associadas a modos vibracionais do grupo fosfato do OPA (νPO_3^{2-} , $\nu\text{P=O}$, $\nu\text{P-O(H)}$)¹⁶⁸, que não foram especificamente atribuídas devido à possibilidade de deslocamentos causados pela interação com o óxido de titânio presente na superfície. A presença da banda larga em $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ e em 1620 cm^{-1} é atribuída ao estiramento do

grupo -OH , indicando a presença de moléculas de água adsorvidas ou estruturadas na matriz híbrida¹⁶⁹, além dos grupos -OH presentes no OPA.

Figura 2.4: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) para as superfícies de Ti modificadas com os filmes híbridos LB-OPA contendo CaCO_3 e ou SrCO_3 .

A fase cristalina depositada nos filmes híbridos foi avaliada por DRX. Como mostrado na Figura 2.5-A, a exposição do filme LB-OPA contendo íons Ca^{2+} à atmosfera de CO_2 (g) levou à formação de CaCO_3 majoritariamente na forma do polimorfo calcita, orientado ao longo da direção (104) de acordo com o pico intenso em $2\theta = 29^\circ$. O difratograma do filme híbrido formado na presença de Sr^{2+} (Figura 2.5-B) indicou a formação de SrCO_3 (estrontianita). Já no caso do filme híbrido formado na presença de Sr^{2+} e Ca^{2+} , observa-se a presença de picos referentes a aragonita e a estroncionita. É reportado na literatura que a presença de Sr^{2+} favorece a precipitação de aragonita em detrimento à calcita. No estudo realizado por Siegel¹⁷⁰, em corais a formação de aragonita foi favorecida em relação à calcita à medida que a concentração de Sr^{2+} aumentou.

A formação preferencial de aragonita no filme híbrido gerado a partir da mistura $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ pode ser compreendida a partir da estrutura cristalina dos diferentes polimorfos do CaCO_3 (Figura 2.6). O polimorfo calcita possui seis átomos de oxigênio coordenados a um átomo de cálcio, enquanto que a aragonita possui número de coordenação igual a nove. No caso do SrCO_3 , devido ao átomo de Sr^{2+} ser maior que o de Ca^{2+} , o único número de coordenação possível para o cátion é nove, resultando que o SrCO_3 é isoestrutural à aragonita. Dessa forma, observamos que para a cristalização do CaCO_3 na presença de

Sr^{2+} , o arranjo dos cátions na interface faz com que se favoreça a estabilização da fase cristalina de aragonita em detrimento da calcita, devido à restrição espacial imposta pela presença dos átomos de Sr^{2+} , que são maiores que os de Ca^{2+} .

Figura 2.5: Difratomogramas de Raios-X (DRX) para as superfícies de Ti modificadas com o filme LB de OPA contendo diferentes cátions: A) $(\text{OPA})_4\text{-Ca}^{2+}$; B) $(\text{OPA})_4\text{-Sr}^{2+}$ e C) $(\text{OPA})_4\text{-Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$. As fases minerais formadas após a exposição das superfícies à atmosfera de CO_2 (g) foram identificadas com os padrões de difração (■) AMCSD#0000098- calcita; (■) AMCSD#0000233- aragonita; (■) AMCSD#0000234- estroncianita e observa-se ainda a presença de picos referentes ao titânio (■) AMCSD#0011195.

Figura 2.6: Aragonita (a,b) possui estrutura cristalina com simetria ortorrômbica, onde um átomo de Ca está coordenado a nove átomos de O. A estroncianita é isoestrutural à aragonita. No caso da calcita (c,d), cuja estrutura cristalina é trigonal, cada átomo de Ca está octaédricamente coordenado com seis átomos de O. Imagem extraída da referência 171.

A bioatividade *in vitro* das superfícies de Ti modificadas com os filmes híbridos contendo CaCO_3 e/ou SrCO_3 foi avaliada por meio da exposição à solução SBF. Após 48 h de exposição, observa-se a formação de um filme particulado e nanoestruturado recobrindo toda a superfície, com morfologia diferente da observada nos filmes híbridos contendo apenas carbonatos (Figura 2.3), indicando a formação de uma nova fase mineral sobre a superfície, como mostram as imagens de MEV (Figura 2.7).

A obtenção de espectros ATR-FTIR (Figura 2.8) para os filmes híbridos após a exposição à solução SBF revelou a presença de uma banda intensa em $\sim 1030 \text{ cm}^{-1}$, associada ao estiramento ν_3 do grupo PO_4^{3-} ,^{172, 173}. O aparecimento dessa banda indica a formação de fosfato de cálcio sobre a superfície de Ti modificada com o filme híbrido, indicando assim a bioatividade das superfícies. A fase cristalina do fosfato de cálcio precipitado será futuramente determinada por DRX.

Figura 2.7: Imagens de MEV para as superfícies de Ti previamente modificadas com os diferentes filmes híbridos, após a exposição à solução SBF por 48 h.

Figura 2.8: Espectros de ATR-FTIR para as superfícies de Ti modificadas com os filmes híbridos LB-OPA contendo CaCO_3 e ou SrCO_3 após a exposição a solução SBF por 48 h.

Os filmes híbridos também foram avaliados com relação às suas propriedades superficiais. A molhabilidade de uma superfície irá ditar como que o fluido corpóreo irá interagir com a superfície, afetando a adesão de proteínas e de células, que são os primeiros eventos que ocorrem na superfície do material implantado^{7,174}. A hidrofiliabilidade dos filmes híbridos foi avaliada por medidas de θ entre as superfícies de Ti modificadas e gotas de água depositadas sobre elas, como mostrado na Tabela 2.3. Além disso, medidas de θ com líquidos de diferentes polaridades foram utilizadas para o cálculo da γ_{SV} e suas respectivas componentes γ_{SV}^p e γ_{SV}^d . Como mostrado na Tabela 2.3, a deposição do filme híbrido sobre as superfícies de Ti alterou suas propriedades superficiais, com o aumento no valor de θ para a água. Esse resultado está em concordância com resultados previamente publicados por nosso grupo^{102,103} e mostra que houve a formação de um filme contínuo que recobriu toda a superfície. Y. Liu et al.¹⁰⁰ não observou qualquer mudança na hidrofiliabilidade de superfícies de Ti devido ao crescimento de cristais isolados de calcita sobre a superfície, o que ressalta a formação de filmes híbridos contínuos pela técnica LB. Não se observam diferenças significativas no valor absoluto de γ_{SV} dos filmes híbridos em relação ao Ti sem modificação. Todavia, o filme híbrido $(\text{OPA})_4\text{-CaCO}_3/\text{SrCO}_3$ resultou em considerável aumento da γ_{SV}^p . Modificações superficiais que promovam o aumento da componente polar são desejáveis para aplicações biomédicas, uma vez que favorecem a adesão de proteínas e de células necessária para o processo de osteointegração^{174,175}. Após a exposição à solução SBF por

48 h, observa-se considerável aumento da hidrofilicidade das superfícies (diminuição de θ) e aumento da γ_{SV} (aumento da reatividade da superfície), que são associados à formação de uma nova fase mineral, com a adição de novos grupos polares devido ao crescimento de fosfatos de cálcio. Esses resultados estão em concordância com a formação de HAp sobre superfícies metálicas após a exposição à solução SBF^{85,102}.

Tabela 2.3: Ângulos de contato (θ) entre gotas de água e as superfícies de Ti antes e após as modificações com os filmes híbridos e seus respectivos valores de energia livre de superfície (γ_{SV})

		θ (água)	γ_{SV} (mJ/m^2)	γ_{SV}^p (mJ/m^2)	γ_{SV}^d (mJ/m^2)
	Ti puro	$47,9 \pm 2,8^\circ$	$45,6 \pm 1,5$	$13,2 \pm 0,7$	$32,4 \pm 2,1$
	CaCO_3	$69,8 \pm 1,7^\circ$	$36,6 \pm 2,4$	$14,5 \pm 3,2$	$22,1 \pm 1,4$
	SrCO_3	$70,6 \pm 3,1^\circ$	$40,1 \pm 1,2$	$23,1 \pm 1,3$	$17,0 \pm 0,7$
	$\text{CaCO}_3/\text{SrCO}_3$	$72,0 \pm 2,5^\circ$	$42,6 \pm 1,4$	$33,3 \pm 3,5$	$9,3 \pm 1,0$
Após SBF por 48 h	CaCO_3	$< 3^\circ$	$72,4 \pm 4,5$	$40,9 \pm 2,3$	$31,5 \pm 4,6$
	SrCO_3	$< 3^\circ$	$71,4 \pm 3,2$	$38,7 \pm 1,6$	$32,7 \pm 2,9$
	$\text{CaCO}_3/\text{SrCO}_3$	$< 3^\circ$	$74,5 \pm 4,9$	$45,8 \pm 3,4$	$28,7 \pm 1,5$

3.2. Resposta biológica *in vitro* dos filmes híbridos

A resposta biológica às superfícies de Ti modificadas com os filmes híbridos foi avaliada utilizando-se cultura *in vitro* de osteoblastos. A análise da viabilidade celular após 7, 14 e 21 dias de cultura (Figura 2.9) mostrou que não houve morte celular devido à presença dos filmes híbridos, indicando que as modificações propostas são atóxicas. No caso do filme $(\text{OPA})_4\text{-CaCO}_3/\text{SrCO}_3$ observa-se aumento de 35% da viabilidade celular no 7º dia em relação ao Ti puro, indicando que a presença do filme híbrido favoreceu a proliferação dos osteoblastos. Por outro lado, no caso dos filmes contendo apenas CaCO_3 ou SrCO_3 , observa-se redução da viabilidade celular de cerca de 20%. Essa redução da viabilidade celular em superfícies contendo CaCO_3 tem sido reportada na literatura^{100,102}.

ALP é considerado um biomarcador fenotípico da diferenciação de osteoblastos, além de ser um indicador do metabolismo ósseo *in vitro*⁷¹. É relatado que em cultura primária de osteoblastos, ALP possui um máximo de atividade próximo ao 14º dia, marcando o início do processo de mineralização, sofrendo então um decréscimo após este período devido ao avançado estágio de mineralização e diferenciação¹⁷⁶. Como mostrado na Figura 2.9-B, observa-se redução da atividade da ALP no 14º dia para os filmes contendo CaCO_3 ou SrCO_3 em relação ao Ti puro. Além disso, observa-se que o máximo de atividade não se dá ao 14º dia, mas sim ao 21º dia. Por outro lado, no caso do filme híbrido contendo $\text{CaCO}_3/\text{SrCO}_3$, observa-se aumento de 54% da atividade no 7º dia em relação ao Ti puro, com o máximo de atividade observado no 14º dia. Esses resultados indicam que no caso dos filmes contendo apenas CaCO_3 ou SrCO_3 pode ter ocorrido um atraso no processo de diferenciação celular. A quantificação dos nódulos de mineralização (Figura 2.9-C) mostra que o filme contendo apenas SrCO_3 resultou em baixa mineralização. Imagens de microscopia confocal dos osteoblastos sobre as superfícies após 14 dias de cultura (Figura 2.9-D) mostram pouca diferença na morfologia dos osteoblastos aderidos sobre as superfícies, o que pode ser explicado pela semelhante energia superficial antes e após as modificações. Todavia, no caso da mistura $\text{CaCO}_3/\text{SrCO}_3$ é possível observar regiões onde as células estão mais espalhadas sobre a superfície (ver seta), o que corrobora o fato de que esse filme possui a maior componente polar (Tabela 2.3).

Os resultados aqui obtidos indicam que uma possível explicação para as diferentes respostas dos osteoblastos aos filmes híbridos esteja relacionada à concentração de Ca^{2+} e Sr^{2+} na interface. É relatado que superfícies com alta concentração de Ca^{2+} afetam a resposta de osteoblastos, sendo necessária uma concentração ideal para a geração de respostas ótimas¹⁷⁷, uma vez que altas concentrações podem ser citotóxicas¹⁷⁸. Em especial, a presença de Ca^{2+} na superfície parece afetar principalmente a fase de adesão e proliferação dos osteoblastos^{177,179}. Ca^{2+} é um íon que está envolvido em diferentes processos de sinalização do metabolismo dos osteoblastos¹⁸⁰, tendo importante influência na atividade de integrinas¹⁸¹ e da ALP¹⁸², por exemplo. A enzima ALP é inibida em altas concentrações de Ca^{2+} , o que revela a importância da concentração interfacial de Ca^{2+} no controle do gatilho da biomineralização¹⁸². Faria et al¹⁸³ recentemente descreveram a formação de filmes híbridos de HAp contendo diferentes quantidades de Ca^{2+} que induzem diferentes respostas em osteoblastos cultivados *in vitro*, sendo que o caso de maior concentração de Ca^{2+} na interface levou à baixa biomineralização após 21 dias de cultura. Assim como para o Ca^{2+} , é relatado a importância da concentração de Sr^{2+} para induzir correta resposta biológica¹¹⁵. Portanto, em nossos resultados, observamos que a mistura $\text{CaCO}_3/\text{SrCO}_3$ apresentou um efeito sinérgico quanto à concentração de Ca^{2+} e Sr^{2+} , favorecendo a proliferação dos osteoblastos e consequente diferenciação. Essa hipótese é válida uma vez que na literatura é reportado o efeito solubilidade interfacial de biomateriais e a sequente resposta celular¹⁸⁴. Dessa forma, a concentração resultante de Ca^{2+} e Sr^{2+} na interface célula-biomaterial controla a sequente evolução celular. Além disso, o filme contendo $\text{CaCO}_3/\text{SrCO}_3$ possui o maior valor de componente polar da energia livre de superfície (Tabela 2.3), sendo essa uma importante característica que influencia a adesão e a proliferação de osteoblastos¹⁷⁴.

Figura 2.9: Cultura *in vitro* de osteoblastos sobre as superfícies de Ti sem modificação (Ct) e após a formação dos filmes híbridos LB- $(\text{OPA})_4$ contendo CaCO_3 , SrCO_3 e $\text{SrCO}_3/\text{CaCO}_3$. A) Porcentagem de viabilidade em relação ao controle após 7, 14 e 21 dias de cultura; B) atividade máxima da fosfatase alcalina (ALP) após 7, 14 e 21 dias de cultura; C) quantificação dos nódulos de mineralização formados após 14 e 21 dias de cultura determinados pela absorbância a 405 nm referente à coloração dos nódulos pelo vermelho de alizarina; D) imagens de microscopia confocal mostrando a morfologia dos osteoblastos sobre as superfícies após 14 dias de cultura, barra de escala representando 50 μm .

4. Conclusões

A deposição dos filmes LB de OPA sobre superfícies de Ti permitiu o crescimento de filmes finos contínuos e homogêneos de CaCO_3 e ou SrCO_3 , cuja composição é dependente da razão molar entre os cátions (Ca^{2+} e Sr^{2+}) presentes na subfase. A formação da fase mineral é mediada pela interação entre os cátions e a cabeça polar do OPA, criando uma matriz organizada de pontos para a nucleação e o crescimento dos cristais. A exposição das superfícies de Ti modificadas com os filmes híbridos contendo $\text{SrCO}_3/\text{CaCO}_3$ à solução SBF mostrou que os materiais são bioativos quanto à precipitação de HAp. Os filmes contendo SrCO_3 e ou CaCO_3 mostraram ser biocompatíveis em não-tóxicos a osteoblastos. Em especial, a associação entre a composição e as propriedades superficiais otimizadas do filme contendo a mistura $\text{CaCO}_3/\text{SrCO}_3$ promoveu o aumento da atividade da ALP e a mineralização dos osteoblastos, indicando assim que a manipulação da concentração de Ca^{2+} e Sr^{2+} nas superfícies é um importante parâmetro para o estímulo de respostas osteogênicas. Os resultados aqui apresentados despertam a importância do uso de filmes LB em mediar a formação de recobrimentos bioativos baseados em biominerais. Em especial, mostramos que a formação de recobrimentos contendo SrCO_3 mostra-se promissora para aplicações biomédicas e precisa ser mais explorada.

CAPÍTULO 3

Síntese, caracterização espectroscópica e formação em monocamadas de Langmuir do complexo morina-Sr²⁺

1. Introdução

Ao longo dos últimos anos, o composto ranelato de estrôncio (RSr) tem sido a alternativa mais utilizada para o tratamento da osteoporose. RSr é um sal do ácido ranélico, que possui dois átomos de Sr²⁺ ligados aos grupos carboxílicos do ácido ranélico (Figura 3.1).

Figura 3.1: Estrutura química do RSr.

Todavia, o tratamento com RSr pode gerar alguns efeitos secundários negativos, como a possibilidade de formação de coágulos sanguíneos, reações adversas na pele e inflamação do fígado, por exemplo¹⁸⁵. Nesse sentido, o desenvolvimento de novos sistemas que atuem como veículo seguro para a liberação de íons Sr²⁺ no corpo humano, minimizando assim os efeitos adversos que o contra-íon possa apresentar, é um tópico com muita relevância clínica. Dessa forma, alguns sistemas tem sido desenvolvidos, como por exemplo, a complexação de Sr²⁺ com folatos (vitaminas do grupo B)^{186,187}. Inspirados pela estrutura do RSr, propomos nesse trabalho a síntese de um novo complexo entre Sr²⁺ e o flavonóide morina (Figura 3.2) para aplicação em sistemas osteoindutores. Flavonóides são compostos polifenólicos encontrados em plantas, flores e frutos. Uma propriedade importante dos flavonóides é sua atividade antioxidante, o que faz com que compostos polifenólicos sejam amplamente aplicados comercialmente como anti-inflamatórios e anticâncer, por exemplo¹⁸⁸. Além disso, devido à estrutura química característica dos flavonóides, esses compostos podem facilmente complexar com íons metálicos¹⁸⁹. Nesse sentido, um dos sistemas mais estudados é a complexação entre o flavonóide morina e diferentes metais, como Al³⁺¹⁹⁰, Ca²⁺¹⁹¹ e lantanídeos¹⁹². Nesse capítulo, serão descritas a formação do complexo morina-Sr²⁺ em solução e em monocamadas de Langmuir.

Figura 3.2: Estrutura química do flavonóide morina.

1.1. Estrutura e características espectrais dos flavonóides

Os flavonóides são constituídos por uma estrutura básica comum a todos os compostos, contendo 15 átomos de carbono dispostos em três anéis (esqueleto C₆-C₃-C₆'), marcados como A, B e C na Figura 3.3. Dependendo do estado de oxidação do anel heterocíclico e do número e natureza dos substituintes aos anéis, os flavonóides podem dar origem a diferentes classificações, como flavonas, isoflavonas e flavonóis (classe a que a morina pertence).

Figura 3.3: Esqueleto básico dos flavonóides.

Essas moléculas são pigmentos responsáveis pela coloração de folhas e flores, e apresentam forte absorção na região do UV-Visível. Dessa forma, espectroscopia de absorção no UV-Vis é a técnica mais apropriada para a análise estrutural dos flavonóides e complexação com íons metálicos. Nessa sessão, faremos uma revisão dos princípios básicos que regem o entendimento das propriedades fotofísicas dos flavonóides.

A forte coloração dos flavonóides é devida à absorção da radiação eletromagnética na região do espectro visível. A absorção de radiação eletromagnética, com um dado comprimento de onda λ na região do UV-vis, por átomos e moléculas é resultado de transições eletrônicas entre níveis energéticos de menor para níveis de maior energia. Assim como para átomos isolados, em uma molécula, o arranjo de elétrons deve obedecer ao Princípio de Exclusão de Pauli, onde para cada orbital deve haver somente dois elétrons alocados com spins de orientação contrárias (emparelhados). Quando uma molécula possui todos os seus orbitais eletrônicos preenchidos de forma emparelhada,

como os flavonóides, esse estado eletrônico é denominado singlete, que denominaremos por S_0 . Além do estado eletrônico de menor energia, o estado fundamental S_0 , em uma molécula há vários estados eletrônicos com energias S_1 , S_2 , S_3 , e por assim adiante. Se uma molécula em seu estado eletrônico fundamental S_0 for irradiada com radiação, ou fótons, cuja energia $h\nu$ seja igual à diferença entre os estados S_0 e S_1 , ocorrerá a absorção de energia e a molécula passara para seu primeiro estado excitado S_1 . A absorção de energia devido à transição eletrônica entre dois estados é quantizada e relacionada por:

$$\Delta E = E(S_1) - E(S_0) = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

onde c é a velocidade da luz, ν é a frequência e λ é o comprimento de onda da radiação. A diferença de energia entre estados eletrônicos refere-se à absorção de radiação na região do UV-Vis (200 a 700 nm). Dentro de cada estado eletrônico S qualquer, os núcleos podem vibrar numa dada frequência pelos seus diferentes modos normais de vibração. O resultado disso é que cada transição eletrônica é acompanhada de um envelope de transições vibracionais entre cada nível vibracional v . As transições eletrônicas acontecem em tempo muito curto, da ordem de 10^{-15} segundos, de modo que a posição dos núcleos não se altera enquanto os elétrons assumem a configuração do estado excitado. Esse é o princípio de Franck-Condon, que descreve as transições eletrônicas como um processo instantâneo representado por uma transição vertical, onde a transição mais intensa se dá do nível vibracional do estado fundamental para o nível vibracional da vertical que está acima dele (Figura 3.4A).

Uma vez que a molécula encontra-se no estado excitado S_1 , haverá então o decaimento para o estado fundamental. Esse decaimento pode acontecer de modo não-radiativo, onde o excesso de energia é transferido para vibrações, rotações e translações das moléculas vizinhas. Outra forma de decaimento é o radiativo, onde a energia de excitação é liberada pela emissão de um fóton. Fenômenos de emissão são representados pelo diagrama de Jablonski (Figura 3.4B). Uma molécula no estado eletrônico S_0 absorve fóton e sofrem transições eletrônicas para os estados eletrônicos excitados (S_1 , S_2 , S_3). O sistema decai então não-radiativamente ao nível vibracional de menor energia do estado excitado S_1 . Nesse ponto, o sistema pode decair radiativamente para o estado S_0 através da emissão de radiação, processo esse conhecido como fluorescência. A fluorescência é uma transição permitida (entre níveis de mesma multiplicidade), com um tempo de vida curto em torno de 10^{-9} segundos. Outro processo que pode ocorrer é o decaimento não-radiativo do estado excitado S_1 que sofre um cruzamento intersistema, onde ocorre uma

inversão de spin que dá origem a um estado triplete excitado (T_1). A molécula pode então decair do estado T_1 para o estado fundamental através da emissão de radiação por um processo chamado fosforescência. A fosforescência é uma transição proibida por spin (diferentes multiplicidades entre o estado fundamental e excitado) e possui um tempo de vida maior que a fluorescência, da ordem de 10^{-3} segundos.

Figura 3.4: (A) O princípio de Franck-Condon afirma que a transição mais intensa se dá do nível vibracional do estado eletrônico fundamental para o estado excitado vibracional que está na vertical acima dele, caracterizando assim transições verticais. A transição eletrônica ocorre num espaço temporal no qual os núcleos não se alteram. Dessa forma, a molécula no estado excitado possui uma geometria em função das coordenadas nucleares (R_1) que é diferente da geometria do estado fundamental (R_0). (B) Diagrama de Jablonski mostrando os diferentes processos fotofísicos que podem ocorrer para uma molécula.

Na figura 3.5 observa-se os espectros de excitação e emissão (fluorescência) da morina. Nota-se que o espectro de emissão é deslocado para maiores valores de λ em relação ao espectro de absorção. Esse fenômeno é conhecido como deslocamento de Stokes. A origem desse deslocamento pode ser compreendida segundo a visão do princípio de Franck-Condon. A absorção da radiação faz com que a molécula estabeleça a configuração eletrônica do estado excitado, enquanto que o arranjo espacial dos núcleos é o mesmo que o do estado fundamental. Processos não-radiativos então ocorrem, de modo que a molécula decaia para o menor nível vibracional do estado excitado. Dessa forma, a emissão de radiação ocorrerá a partir da molécula no estado excitado, com os núcleos arranjados na configuração do estado fundamental, mas com a distribuição eletrônica do estado excitado (distribuição R_1). Tendo em vista que a diferença de energia entre os dois estados é maior quando a molécula está na geometria do estado fundamental

(R₀) comparada com a geometria do estado excitado (R₁), a emissão ocorrerá em valores de λ maiores que os da absorção.

Figura 3.5: Espectros de excitação e emissão da morina (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução metanol:água 80:20 em pH = 3)¹⁹³. Observa-se que o máximo de emissão ocorre em valores maiores de λ (menor energia), caracterizando o deslocamento Stokes.

A absorção de radiação pela molécula fluorescente leva à formação de uma população inicial (N_0) de moléculas no estado excitado. A taxa de decaimento para o estado fundamental dessa população inicial de moléculas excitadas é

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_{fl} + k_{nr})N(t)$$

onde $N(t)$ é o número de moléculas excitadas em um tempo t após a excitação, k_{fl} é a taxa de emissão da fluorescência e k_{nr} é a taxa de decaimentos não-radiativos. Em $t = 0$, $N(t) = N_0$, então podemos integrar a equação anterior de modo a obter

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau}$$

onde $\tau = (k_{fl} + k_{nr})^{-1}$ é o tempo de vida do estado excitado. τ pode ser interpretado como o tempo médio que a molécula permanece no estado excitado. Espera-se que a intensidade de fluorescência $F(t)$ seja proporcional à população de moléculas excitadas, então:

$$F(t) = k_{fl} N(t)$$

O tempo de vida da fluorescência é o tempo necessário para que a intensidade decaia para $1/e$ do seu valor inicial. Dessa forma, τ pode ser determinado a partir da curva $\log F(t)$ versus t . Uma molécula pode não ter um comportamento monoexponencial, mas ter o tempo de vida composto por várias componentes devido à diferentes espécies emissoras no estado excitado. Dessa forma, o decaimento exponencial será decomposto em componentes, de acordo com a equação

$$F(t) = \sum_i B_i e^{t/\tau_i}$$

onde τ_i representa as diferentes componentes do tempo de decaimento e B_i é a amplitude das componentes em $t = 0$. Cada valor τ_i representa uma espécie emissora individual, e a intensidade fracional f_i de cada uma dessas espécies é dada por

$$f_i = \frac{B_i}{\sum_i B_i \tau_i}$$

Nesse capítulo, descreveremos a formação do complexo entre morina e Sr²⁺. A composição do complexo será caracterizada com o uso de diferentes técnicas espectroscópicas. Em especial, caracterizaremos as propriedades fotofísicas da morina complexado a Sr²⁺. Essa caracterização dos padrões de absorção e fluorescência da morina é importante para a elucidação estrutural do complexo formado. Além disso, o conhecimento dessas propriedades abre uma janela analítica para a identificação de Sr²⁺ em diferentes meios, fato esse importante uma vez que visamos a aplicação desse complexo em sistemas biológicos. Por fim, estudaremos a formação *in situ* do complexo entre morina e Sr²⁺ em monocamadas de Langmuir. Sua imobilização em matrizes orgânicas com alto grau de organização estrutural poderá ser utilizada na criação de recobrimentos bioativos para superfícies metálicas, que é o objeto dessa dissertação.

2. Parte Experimental

2.1. Síntese e caracterização espectroscópica

2.1.1. Estudo da formação do complexo morina-Sr²⁺ por espectroscopia de absorção no UV-Vis

Foram preparados 3,0 mL de solução metanólica (J.T.Baker, padrão HPLC) de morina 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (hidrato de morina, Acrôs Organics, MW = 302,24 g.mol^{-1}). SrCl₂ foi adicionado à solução de morina em diferentes concentrações. Partiu-se de uma solução aquosa de SrCl₂ 0,01 mol L^{-1} , e 5,0 μL de solução de NH₄OH (Dinâmica, 28-30% teor em NH₃) foram adicionados para garantir a desprotonação da morina. As soluções foram mantidas em repouso por 2 h antes da obtenção de espectros eletrônicos de absorção no UV-Vis no espectrofotômetro Hewlett Packard 8453, usando cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,00 cm, a 25°C.

2.1.2. Medidas de fluorescência estática

Medidas de fluorescência estacionária foram obtidas para as soluções de morina na presença de Sr²⁺ preparadas conforme descrito anteriormente, usando o espectrofluorímetro Hitachi F-700 (DFM/FFCLRP), que possui lâmpada de xenônio de 150 W como fonte de excitação. As amostras foram excitadas em 414 nm e largura de banda de excitação igual a 5 nm.

2.1.3. Medidas de fluorescência resolvida no tempo

Para medidas com resolução temporal, foi usado um sistema baseado no método de correção temporal de fótons únicos, usando laser pulsado Tsunami 3950 (Spectra Physics) de titânio-safira bombeado por laser de estado sólido Millennia Xs (Spectra Physics). A frequência dos pulsos gerados no Tsunami foi ajustada para 8,0 MHz pelo Pulse Picker 3986 (Spectra Physics). O comprimento de onda do laser foi selecionado com o gerador do segundo harmônico (LBO Crystal, GWN-23PL Spectra Physics), de modo a obter pulsos de excitação a 424 nm que foram direcionados com o auxílio de espelhos para um espectrômetro em formato L Edinburg FL900 com um monocromador no canal de emissão. Os fótons emitidos foram detectados a 545 nm pela

fotomultiplicadora refrigerada Hamamatsu C4878. Curvas de decaimento foram analisadas com o software F900 fornecido pela Edinburg Instruments, e a inspeção do ajuste dado pelo software foi feita pela observação dos gráficos de resíduo e do parâmetro estatístico χ^2 . Intensidade $I(t)$ foi ajustada com a curva de decaimento multi-exponencial

$$I(t) = I_0 \sum_i B_i e^{-\frac{t}{\tau_i}},$$

onde I_0 é a intensidade inicial, B_i e τ_i são o fator pré-exponencial (amplitude de cada componente) normalizado e o tempo de vida do componente i da curva de decaimento, respectivamente, ao longo do tempo t .

2.1.4. Isolamento e caracterização do complexo morina-Sr²⁺

0,151 g de hidrato de morina e 100,0 μ L de solução de NH₄OH foram adicionados a 50,0 mL de metanol, agitando até completa solubilização, conforme protocolo desenvolvido em nosso laboratório. A solução resultante é marrom-avermelhado. Adicionou-se então 0,399 g de SrCl₂, a solução tornando-se marrom-esverdeado. A mistura foi então agitada por 2 horas e centrifugada para a remoção do precipitado. O precipitado foi lavado com solução t-butanol: clorofórmio (1:1, v:v) e seco em dessecador. A estrutura do complexo isolado foi determinada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Espectros de ¹H-RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance DRX-500 (DQ/FFCLRP) e os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado.

2.2. Formação do complexo morina-Sr²⁺ em monocamadas de Langmuir

2.2.1. Estudo das monocamadas

A interação entre morina e monocamadas de ácido octadecilfosfônico (OPA, Sigma-97%, 334,47 g.mol⁻¹) foi estudada em uma cuba de Langmuir (Insight, Brasil, 216 cm²), a 25°C. Para isso, 30 µL de OPA (2,0 mmol L⁻¹) solubilizado em mistura clorofórmio:metanol (3:1, v/v) foram espalhados sobre a subfase contendo água deionizada (tensão superficial 72,3 mN m⁻¹ e condutividade 1,1µS cm⁻¹ a 25°C) ou solução aquosa de SrCl₂ (2,0 mmol L⁻¹). Após o espalhamento do lipídeo, diferentes volumes da solução de morina (30 mmol L⁻¹, em metanol) foram espalhados lentamente, gota a gota, sobre toda a superfície da cuba. Após esperar 5 min para equilíbrio do sistema, isothermas π versus A foram obtidas com velocidade de compressão de 0,42 mm s⁻¹. Espectros de absorção no UV-Vis foram obtidos simultaneamente à compressão da monocamada com o espectrofotômetro portátil modelo USB2000+ (Ocean Optics, EUA) acoplando-se uma fibra ótica (50 µm de diâmetro) para guiar a luz na interface líquido-ar.

2.2.2. Microscopia de fluorescência acoplada à cuba de Langmuir

A morfologia das monocamadas de OPA na presença da morina foi investigada com o uso da microscopia de fluorescência. Para isso, 10 µL de OPA (2,0 mmol L⁻¹) solubilizado em mistura clorofórmio:metanol (3:1, v/v) foram espalhados sobre a subfase contendo água deionizada (tensão superficial 72,3 mN m⁻¹ e condutividade 1,1µS cm⁻¹ a 25°C) ou solução aquosa de SrCl₂ (2,0 mmol L⁻¹). Após o espalhamento do lipídeo, 30 µL da solução de morina (30 mmol L⁻¹, em metanol) foram espalhados lentamente, gota a gota, sobre toda a superfície da cuba (Insight Brasil, 56 cm² de área). Imagens de fluorescência foram obtidas através de um microscópio ótico (Olympus BX50) acoplado à cuba de Langmuir, com excitação em 390 nm e lente de aumento de 10x.

2.2.3. Microbalança a cristal de quartzo

A massa transferida pelos filmes LB foi medida com o uso da microbalança a cristal de quartzo (QCM), que relaciona a variação da frequência ΔF (Hz) de um cristal piezoelétrico de quartzo devido à adsorção de uma dada massa m , de acordo com a equação de Sauerbrey:

$$\Delta F = \frac{2F_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_c \rho_c}}$$

onde F_0 é a frequência inicial, μ_c é o módulo de cisalhamento do quartzo, ρ_c a densidade do quartzo, ΔF a variação de frequência, A é a área do eletrodo e Δm é a massa total depositada em ambas faces do cristal.

Para essa quantificação, filmes LB de OPA na presença da morina foram depositados sobre um cristal de quartzo (International Crystal Manufacturing, 10 MHz). Os filmes foram construídos espalhando-se 30 μL de solução de OPA (2,0 mmol L^{-1}) e 100 μL de solução de morina (30,0 mmol L^{-1}) em subfase contendo SrCl_2 2,0 mmol L^{-1} . As deposições foram realizadas mantendo π constante em 30 mN m^{-1} e com velocidade de deposição de 0,038 mm s^{-1} . Os cristais foram secos em fluxo de N_2 (g) antes da medida da frequência. A frequência de oscilação (ICM Lever Oscillators, 10 MHz) foi mensurada utilizando um frequencímetro Lutron FC2700TCXO.

3. Resultados e Discussão

3.1. Síntese e caracterização do complexo morina-Sr²⁺

A formação do complexo morina-Sr²⁺ em metanol foi avaliada por espectroscopia eletrônica de absorção no UV-Vis. O espectro de absorção da morina em metanol (Figura 3.6) mostra a presença de duas bandas principais: uma banda centrada em 260 nm (banda II) e outra centrada em 366 nm (banda I). A banda II origina-se de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel A (sistema benzênico) e a banda I associada a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel B (sistema cinamóil)¹⁹⁴. Como mostrado na Figura 3.6-A, a adição de Sr²⁺ à solução de morina promove o deslocamento batocrômico de cerca de 22 nm das bandas originais, surgindo uma nova banda centrada em 410 nm. Esse deslocamento é associado à formação do complexo morina-Sr²⁺. A presença do metal coordenado ao ligante diminui a diferença entre os níveis de energia dos orbitais HOMO e LUMO da morina. Santos et al.¹⁹⁶ mostraram que a complexação entre 3-hidroxi-flavona e Al³⁺ reduz o valor de ΔE entre os orbitais HOMO e LUMO do flavonóide na ordem de 0,04 Hartree. Ao se observar estrutura da morina (Figura 3.6B), é evidente que a complexação ocorrerá com a carbonila do átomo de carbono 4 e as hidroxilas vizinhas situadas nos carbonos 5 ou 3. Uma vez que o grupo 3-OH possui maior habilidade quelante que o grupo 5-OH, acredita-se que a complexação ocorra entre Sr²⁺ e os grupos 3-OH e 4C=O. Complexos entre metais e esse sítio de ligação têm sido relatados para Ca²⁺¹⁹¹, Mg²⁺¹⁹¹, Cu²⁺¹⁹⁵, Al³⁺¹⁹⁰ e lantanídeos¹⁹².

Figura 3.6: Espectros eletrônicos de absorção no UV-Vis para a solução de morina (100 $\mu\text{mol/L}$) após adição de diferentes concentrações de SrCl₂.

A estequiometria do complexo morina-Sr²⁺ foi estimada pelo método de Job (método da variação contínua), medindo-se a absorbância da solução contendo diferentes fração em mol de morina, no comprimento de onda 410 nm, que é associado à máxima absorção do complexo. Considerando um equilíbrio global entre Sr²⁺ e n ligantes (L) para formar o complexo SrL _{n} , temos que

onde n é determinado a partir do gráfico de máxima absorbância do complexo em função da fração em mol (χ) do ligante, onde $n = \frac{\chi_{\text{máx}}}{1 - \chi_{\text{máx}}}$. Dessa forma, a partir do gráfico da Figura 3.7, podemos estimar que $n = 1$, logo a estequiometria do complexo é 1:1.

Figura 3.7: Gráfico de Job mostrando a absorbância à 410 nm obtida para as soluções contendo diferentes frações em mol de morina, na presença de Sr²⁺.

A Figura 3.9 mostra os espectros de emissão obtidos para soluções de morina contendo diferentes concentrações de Sr²⁺, excitados em 414 nm. Em meio básico (Figura 3.9-A), observa-se um aumento considerável da luminescência à medida que se aumenta a [Sr²⁺], atingindo regime de saturação a partir de 50 $\mu\text{mol/L}$. Além disso observa-se o deslocamento hipsocrômico do máximo de emissão, passando de 550 nm (sem adição de Sr²⁺) a 520 nm. O aumento da intensidade de fluorescência pode ser atribuído à inibição do processo de transferência de próton intramolecular no estado excitado entre os grupos hidroxila e carbonila adjacentes, uma vez que esse processo causa a formação de tautômeros não-emissivos ou com baixa emissão à temperatura ambiente¹⁹⁰, como esquematizado na Figura 3.8.

Figura 3.8: Fototautomerização da 3-hidroxi-flavona.

Figura 3.9: A) Espectros de emissão para a solução de morina (100 µmol/L) após adição de SrCl₂ em diferentes concentrações. B) Curvas de decaimento do estado excitado para solução de morina (100 µmol/L) após adição de diferentes concentrações de SrCl₂.

A análise do estado excitado foi realizada por meio da obtenção de curvas de decaimento de intensidade de fluorescência em função do tempo para os sistemas morina-Sr²⁺. Como mostrado na Figura 3.9-B e pelos tempos de decaimento (τ) calculados mostrados na Tabela 3.1, as curvas de decaimento obtidas são multiexponenciais devido aos diferentes processos moleculares que ocorrem no estado excitado da morina¹⁹⁰. Como observado na Figura 3.9-B, a adição de Sr²⁺ à solução de morina faz com que a componente com maior peso para a curva de decaimento possua maior tempo de vida, atribuído ao complexo, cujo τ é maior devido à inibição do processo de transferência intramolecular do próton. Esse resultado está em concordância com os obtidos para complexos morina-Al³⁺¹⁹⁰ e morina-Mg²⁺¹⁹⁷.

Tabela 3.1: Parâmetros obtidos pelo ajuste da curva de decaimento do estado excitado das soluções de morina (100 µmol L⁻¹) contendo diferentes concentrações de Sr²⁺

	0	10 µmol/L	50 µmol/L	100 µmol/L
τ_1 (ns)	2,602	3,389	3,565	3,491
τ_2 (ns)	0,383	1,469	1,775	1,535
τ_3 (ns)	0,142	0,004	0,047	0,061
B_1	0,012	0,029	0,030	0,030
B_2	0,037	0,021	0,035	0,030
B_3	0,094	0,089	0,127	0,051
f_1 (%)	52,9	69,6	60,7	66,35
f_2 (%)	24,3	22,5	35,8	29,13
f_3 (%)	22,8	7,8	3,44	4,52
χ^2	1,099	1,085	1,108	1,097

Como descrito na parte experimental, foi possível isolar o complexo morina-Sr²⁺, obtendo um pó marrom escuro ligeiramente solúvel em metanol. O espectro de absorção para o sólido obtido solubilizado em metanol é mostrado na Figura 3.10. Nota-se que o máximo de absorção é centrado em 410 nm, assim como atribuído à formação do complexo morina-Sr²⁺ em solução (Figura 3.6), indicando que houve o isolamento do complexo.

Figura 3.10: Espectro eletrônico de absorção no UV-Vis para o complexo morina-Sr²⁺ solubilizado em metanol, após ser isolado.

A estrutura do complexo morina-Sr²⁺ foi elucidada por espectroscopia de ¹H-RMN. Os deslocamentos químicos (δ) obtidos para os átomos de H a partir dos espectros de ¹H-RMN estão sumarizados na Tabela 3.2. Nota-se que a complexação da morina com

Sr²⁺ promove o deslocamento dos sinais das hidroxilas no espectro de ¹H-RMN para campo alto, uma vez que a coordenação com o metal aumenta a conjugação. Não se observa no espectro do complexo o sinal referente à hidroxila 3-OH. Isso indica que a coordenação ocorreu via a desprotonação da hidroxila situada no carbono 3 e a carbonila vizinha situada no carbono 5. Os valores de δ obtidos estão em concordância com resultados descritos na literatura^{191,192}.

Tabela 3.2: Deslocamentos químico (em ppm) observados para os átomos de H identificados nos espectros de ¹H-RMN obtidos para a morina e o complexo morina-Sr²⁺ (a correspondência dos prótons está mostrada nas figuras 3.11 e 12)

Composto	5-OH	7-OH	3-OH	4'-OH	2'-OH	H-6'	H-5'	H-8	H-3'	H-6
Morina	12,62	10,70	9,76	9,38	9,40	7,22	6,39	6,34	6,28	6,17
Morina-Sr²⁺	14,67	12,79	-	9,50	9,52	7,45	6,35	6,27	6,13	6,29

Figura 3.11: Espectro de ¹H-RMN da morina em DMSO deuterado.

Figura 3.12: Espectro de ¹H-RMN do complexo morina-Sr²⁺ em DMSO deuterado.

A partir dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas espectroscópicas apresentadas até aqui, concluímos que a estrutura do complexo formado é via coordenação com os grupos 3-OH e 5C=O.

Figura 3.13: Esquema da formação do complexo morina-Sr²⁺

3.2. Formação do complexo morina-Sr²⁺ em monocamadas

Visando a aplicação do complexo morina-Sr²⁺ como recobrimentos bioativos para superfícies metálicas, estudamos a sua formação *in situ* em monocamadas de OPA. A adição de morina na interface líquido-ar promove a expansão da monocamada de OPA, como observado na Figura 3.14. Essa expansão da monocamada indica a incorporação de moléculas de morina na monocamada de OPA. Figura 3.14-B mostra variações de π em função da área da cuba obtida para a morina espalhada em subfase aquosa. Observa-se que o flavonóide possui atividade superficial, uma vez que se nota o aumento de π à medida que a monocamada é comprimida. Valores de π próximos a 30 mN m⁻¹ são obtidos ao final da compressão com Cs⁻¹ da ordem de 10-80 mN/m. Uma vez que a morina possui grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, é de se esperar alguma atividade superficial, mas a ausência de caudas hidrofóbicas longas dificulta que o empacotamento das moléculas atinja estados de alta condensação. Poucos estudos na literatura relatam o estudo de flavonóides em monocamadas de Langmuir. Todavia, há resultados obtidos para 3-hidroxi-flavona¹⁹⁶ e quercetina^{198,199} que relatam a obtenção de monocamadas para os flavonóides puros com valores de área ocupada por molécula da ordem de 100 Å²/molécula. Os valores de área ocupada por molécula encontrados para a morina são na ordem de 0,30 Å²/molécula, o que pode ser explicado devido à maior solubilidade da morina em água quando comparado a quercetina e a 3-hidroxi-flavona. Dessa forma, o espalhamento da solução de morina na interface líquido-ar primeiro provoca a solubilização na subfase até que se atinja a saturação necessária na interface para a formação da monocamada. Voltando a analisar a Figura 3.14-A, observamos que a adição de morina na monocamada leva à sua expansão para maiores valores de A, o que indica a incorporação de moléculas de morina na monocamada. Nota-se que essa expansão é observada ao longo de toda a isoterma, o que indica que a o flavonóide não é expulso da monocamada, mesmo em altos valores de π . Interessante é o fato de que a expansão da monocamada é maior quando a subfase contém íons Sr²⁺, o que nos leva a inferir que a organização das moléculas de morina na interface é influenciada pela presença de Sr²⁺. Essa maior expansão é demonstrada pela variação dos valores de área mínima das monocamadas (ΔA) (Tabela 3.3) antes e após a adição de morina em subfases de água pura ou contendo Sr²⁺, onde ΔA é maior na presença de Sr²⁺. As moléculas de morina podem estar inseridas na monocamada através do estabelecimento de ligações de hidrogênio com a cabeça polar do OPA. Alguns estudos relatam sua inserção entre a parte

hidrofílica e hidrofóbica da monocamada^{198,199}. Todavia, a presença de Sr²⁺ na subfase muda o arranjo das moléculas de morina na interface, devido a formação do complexo morina-Sr²⁺. O módulo compressional C_s^{-1} das monocamadas de OPA diminui com a adição de morina, devido ao aumento da elasticidade induzida pela inserção das moléculas (Tabela 3.3). Monocamadas mais elásticas foram obtidas na presença de Sr²⁺, nos dando outra evidência da diferença no arranjo das moléculas de morina na interface.

Figura 3.14: A) Isotermas π versus A para as monocamadas de OPA em subfases contendo água pura ou solução aquosa de SrCl_2 2,0 mmol L⁻¹. A solução de morina foi adicionada à interface na proporção de 50:1 (n/n) em relação ao OPA. B) Variação de π em função da área disponível na cuba obtida espalhando-se 300 μL de solução de morina 30,0 mmol L⁻¹ de morina em metanol.

Tabela 3.3: Valores de área mínima e C_s^{-1} e suas respectivas variações antes e após a adição de morina nas monocamadas de OPA

	$A_{\text{mínima}}^*$ (Å²/molécula)	ΔA (Å²/molécula)	C_s^{-1} (mN/m)	ΔC_s^{-1} (mN/m)
OPA – água	25	-	303	-
OPA – SrCl_2	18	-	418	-
OPA – morina – água	39	14	212	91
OPA – morina – SrCl_2	44	26	257	161

* Os valores de área mínima foram calculados a partir da reta tangente à isoterma no estado condensado ($\pi \sim 40 \text{ mN m}^{-1}$).

A formação do complexo morina-Sr²⁺ na interface líquido-ar foi atestada com a obtenção de espectros eletrônicos *in situ* (Figura 3.15). A presença de Sr²⁺ na subfase promove o deslocamento da banda de absorção da morina em 10 nm, indicando a complexação da morina com Sr²⁺ presentes na interface. Nota-se ainda um leve aumento na intensidade dos espectros à medida que aumenta-se o valor de π , devido ao aumento na quantidade de moléculas de morina na interface (moléculas/área) com o aumento da

compactação da monocamada. A obtenção de imagens de fluorescência das monocamadas de OPA contendo morina na presença e ausência de Sr²⁺ revela grandes diferenças (Figura 3.16). Devido à baixa fluorescência da morina, não se observa luminescência das monocamadas de OPA na presença de morina. Todavia, a presença de Sr²⁺ na subfase faz com que se observe aglomerados luminescentes na monocamada, devido ao aumento da fluorescência ocasionado pela complexação com íons Sr²⁺, como explicado anteriormente. Além disso, com o aumento de π nota-se a compactação dos aglomerados luminescentes na interface, devido a formação de monocamadas mais condensadas. Através dos resultados aqui apresentados propomos um modelo para a formação do complexo morina-Sr²⁺ na interface líquido-ar representado pela Figura 3.17.

Figura 3.15: Espectros de absorção na região do UV-Vis obtidos para as monocamadas de OPA em subfases contendo água pura (A) ou solução aquosa de SrCl₂ 2,0 mmol L⁻¹ (B). A solução de morina foi adicionada à interface na proporção de 50:1 (n/n) em relação ao OPA. Os espectros foram obtidos *in situ* para as monocamadas em diferentes valores de π (em mN/m).

Figura 3.16: Imagens obtidas com o microscópio de fluorescência acoplado à cuba de Langmuir para as monocamadas de OPA em diferentes valores de π (mN m⁻¹) em subfases contendo água pura ou solução aquosa de SrCl_2 2,0 mmol L⁻¹. A solução de morina foi adicionada à interface na proporção de 50:1 (n/n) em relação ao OPA.

Figura 3.17: Esquema proposto para a interação da morina nas monocamadas de OPA. A adição de morina interface promove a expansão da monocamada de OPA, indicando que as moléculas de morina interagem preferencialmente na região da cabeça polar, ocupando espaço na interface. A adição de Sr^{2+} nessa monocamada promove uma nova expansão da monocamada, uma vez que a formação do complexo com Sr^{2+} promove a reorganização das moléculas de morina na interface, expandindo a monocamada.

A massa transferida pelos filmes LB foi quantificada pela técnica da QCM, em subfases contendo SrCl_2 e com o espalhamento de morina na interface (proporção 50:1). De acordo com a Figura 3.18, nota-se o crescimento linear da massa depositada como aumento no número de camadas, com coeficiente de correlação linear superiores a 0,9. Uma vez que sabemos a área do cristal em que o filme foi depositado e sabemos o valor de área ocupada por molécula de OPA em $\pi = 30$ mN m⁻¹, é possível calcular a massa teoricamente esperada a ser depositada por camada de filme LB, considerando uma razão de transferência igual a 1. Como mostrado na Tabela 3.4, a massa depositada por camada

para os filmes LB de OPA é igual ao valor teoricamente esperado, indicando que a deposição foi bem-sucedida. Por outro lado, os filmes depositados na presença de morina apresentaram valor de massa depositada por camada superior ao esperado teoricamente. Esse aumento na massa depositada nos leva a inferir que houve a transferência do complexo morina-Sr²⁺.

Figura 3.18: Massa depositada pelos filmes LB com o aumento do número de camadas.

Tabela 3.4: Valores obtidos de massa depositada através da QCM

	Massa por camada (ng)*	Massa teórica (ng)	Correlação linear (R ²)
OPA-Sr²⁺	229 ± 8	229 ng	0,9998
OPA-Sr²⁺ - morina	182 ± 6	100 ng	0,9896

* A massa depositada por camada é o coeficiente angular obtido do ajuste linear nos dados da QCM.

4. Conclusões

A formação do complexo morina-Sr²⁺ foi caracterizada por diferentes técnicas espectroscópicas. A adição de Sr²⁺ à solução de morina provoca o deslocamento batocrômico do máximo de absorção para 410 nm, indicando que houve a formação do complexo morina-Sr²⁺, com estequiometria 1:1. A estequiometria do complexo foi confirmada por espectroscopia de RMN, indicando que a complexação ocorre entre a carbonila 5C=O e a hidroxila desprotonada 3-OH. A formação do complexo morina-Sr²⁺ provoca o aumento da intensidade de fluorescência da morina e a formação de espécies luminescentes com maiores tempo de vida. Quanto à formação do complexo morina-Sr²⁺ em monocamadas de Langmuir, observamos que a adição de morina à interface líquido-ar promove a expansão da monocamada de OPA, indicando que as moléculas de morina interagem preferencialmente na região da cabeça polar, ocupando espaço na interface. A adição de Sr²⁺ à subfase provoca uma nova expansão da monocamada, uma vez que a formação do complexo com Sr²⁺ promove a reorganização das moléculas de morina na interface, expandindo a monocamada. Dessa forma, podemos formar multicamadas do filme LB contendo o complexo morina-Sr²⁺ sobre suportes sólidos, indicando que essa metodologia de imobilização é promissora para o desenvolvimento de novos recobrimentos bioativos para implantes de substituição óssea.

CAPÍTULO 4

Filmes auto-organizados de colágeno

1. Introdução

Moléculas de colágeno representam o bloco construtor mais abundante no corpo humano, com a função de prover estabilidade, elasticidade e resistência mecânica para tecidos conectivos moles, tecido ósseo e matriz extracelular²⁰⁰. Colágeno é encontrado sob diferentes formas na natureza, especificamente organizado em arranjos hierárquicos que originam rebuscadas estruturas e funcionalidade para os tecidos que por ele são compostos. Cada molécula de polipeptídeo (chamada de procolágeno) é uma α -hélice formada pela sequência tripeptídica Gly-X-Y (onde geralmente X é prolina e Y é 4-hidroxiprolina) que adota uma estrutura helicoidal anti-horária com três resíduos por volta. Então, três cadeias de polipeptídeo se unem para formarem uma tripla hélice orientada no sentido horário (Figura 4.1 a-b). Tipicamente, um mamífero pode possuir mais de 30 variações estruturais de colágeno, podendo variar quanto ao tipo de tecido em que é encontrado, sequência peptídica e funcionalidade. Colágeno tipo I é o mais comumente encontrado, formado por uma tripla hélice de duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ que se auto-organizam em estruturas fibrilares tridimensionais que exibem um característico padrão de estrias. Moléculas de colágeno hidratadas possuem aproximadamente 1,6 nm de diâmetro e 300 nm de comprimento (quando empacotadas na forma de fibrilas). Durante a fibrilogenese, moléculas de colágeno são empacotadas em fibrilas que exibem um padrão de estrias de 67 nm, formadas por uma região densa de 27 nm (chamada de região de *overlap*, do inglês) e outra região menos densa de 40 nm (região de *gap*). Smith²⁰¹ propôs que uma fibrila de colágeno tem o diâmetro equivalente a 5 moléculas, onde cada molécula está escalonada por um período d. Esse arranjo de cinco moléculas (chamado de microfibrilas) corresponde ao diâmetro de 2-3 nm observado para estruturas colagenosas *in vivo*. Cada molécula é 4,46 d em comprimento e um vazio de 0,54 d (36 nm) existe no final das moléculas de colágeno que não estão se sobrepondo. Moléculas adjacentes se sobrepõem por uma região de 0,46 d ou 31 nm. Dessa forma, a região de vazio (*gap*) de 0,54 d somada com a região de sobreposição (*overlap*) de 0,46 d nos dá o espaçamento das fibrilas de colágeno em estrias de 67 nm. Moléculas de colágeno auto-organizadas em fibrilas se agrupam em feixes tridimensionais com dimensão que varia de micrometros à escala milimétrica. Esses feixes são formados por fibrilas dispostas paralelamente e associadas entre si por meio de interações interfibrilares.

Figura 4.1: Estrutura hierárquica do colágeno tipo I. (a) Cadeias em hélices de procolágeno (vermelho, azul e verde) associam-se para formar a tripla hélice de aproximadamente 300 nm em comprimento. (b) Representação esquemática da tripla hélice formada por 3 moléculas de procolágeno. (c) Auto-organização das moléculas de colágeno em fibrilas. (d) Camadas de fibrilas de colágeno em uma seção transversal da pele. (e) Fibrilas de colágeno com aproximadamente 100 nm de diâmetro observadas por microscopia eletrônica de transmissão, identificando o característico padrão de estrias de 67 nm. (f) Imagem de microscopia de força atômica evidenciando as estrias ao longo das fibrilas com dimensão de 67 nm. Essa imagem foi extraída da referência ⁶⁶.

Em muitos sistemas biológicos, colágeno tipo I exibe uma estrutura líquido-cristalina, sendo seu estado natural, que provém orientação à longas distâncias²⁰². Cristais líquidos é um estado da matéria intermediário entre sólidos cristalinos e líquidos amorfos. Há basicamente três fases de cristais líquido: nemática, esmética e colestérica. Fases nemáticas são aquelas em que há orientação a longas distancias das moléculas ao longo de um dado eixo. Fases esméticas são compostas por camadas de moléculas, onde em cada camada há um eixo de orientação preferencial das moléculas. Fases colestéricas são um exemplo de fase nemática quiral, onde as moléculas encontram-se orientadas em planos paralelos um aos outros, mas a orientação em cada plano é rotacionada por um ângulo constante em relação ao próximo plano. A formação de fases colestéricas pode ser esquematizada pelo modelo da “madeira contorcida”, onde cada camada de moléculas é representada por um retângulo orientado em uma dada direção. A direção da orientação das moléculas (representada por linhas equidistantes e paralelas) é rotacionada entre um retângulo e outro por um ângulo fixo e constante, construindo então uma periodicidade dada por uma rotação anti-horária de 180° ao longo do eixo colestéricos. Uma rotação de 180° ao longo do eixo colestérico corresponde ao passo $P/2$ da estrutura. Giraud-Guille²⁰³

demonstrou que a organização de fibrilas de colágeno no ósteon presente no osso pode ser descrita por uma série de arcos superpostos, em que em cada arco as fibrilas estão orientadas numa dada direção como resultado da arquitetura colestérica das fibrilas de colágeno no tecido ósseo.

Figura 4.2: A) Fases de cristais líquidos e B) modelo de “madeira retorcida” para as fases colestéricas. C) Imagens de MEV das fibrilas de colágeno em um ósteon, indicando que as fibrilas estão dispostas em arcos superpostos e em cada arco as fibrilas estão orientadas numa dada direção. Imagem adaptada da referência ²⁰⁴.

A organização de moléculas de colágeno em tecidos nativos, como córnea, pele e osso se assemelha à estrutura observada para sistemas de cristais líquidos^{60,204,205}. Todavia, a observação do comportamento líquido-cristalino das moléculas de colágeno *in vitro* é observada apenas em pH ácido, onde a forte repulsão entre os monômeros negativamente carregados evita sua agregação²⁰⁶. Uma vez que as moléculas de colágeno estejam organizadas na forma de cristais líquidos, a elevação do pH do meio intensifica as interações hidrofóbicas entre as moléculas, o que promove a formação de fibrilas de colágeno sem a ruptura da orientação e organização das moléculas. A estrutura então formada é fortemente dependente da concentração de colágeno no meio. Comportamento de cristais líquidos surge para concentrações de colágeno em meio ácido da ordem de 40 a 80 mg/mL²⁰⁷. É relatada a organização das moléculas de colágeno em estruturas colestéricas em concentrações da ordem de 80 mg/mL²⁰⁶. Essa concentração é similar ao valor encontrado para a presença de procolágeno em vesículas excretoras de células²⁰⁸. Moléculas de colágeno são excretadas para a matriz extracelular estruturada de acordo com a fase nemática. Muitos estudos têm relatado a fibrilogênese *in vitro* de moléculas de colágeno à partir de soluções ácidas através do aumento do pH pela adição de NaOH ou amônia devido à redução das repulsões intermoleculares^{209–211}. As matrizes assim formadas, na forma de géis, têm sido exploradas para estudos de cultura celular²⁰⁹,

engenharia de tecidos²¹² e biomineralização⁶². Enquanto a formação de géis com estruturas líquido-cristalinas estabilizadas é um processo bem relatado na literatura, a formação de filmes finos com essas propriedades tem sido pouco explorada. Tang et al²¹³ mostraram que a compressão contra uma superfície de vidro de uma gota de solução concentrada de colágeno produz um filme fino com certo grau de propriedades líquido-cristalinas. Todavia, essa metodologia possui baixa reprodutibilidade e resulta em filmes pouco homogêneos e com baixo grau de cristalinidade. Kirkwood et al²⁰⁵ descreveram a formação de filmes finos exibindo uma arquitetura colestérica sob diferentes superfícies através da aplicação de soluções de colágeno (20 mg/mL) com uso de fluxo hidrodinâmico associado à rápida secagem, processo esse que influencia a orientação das fibrilas de colágeno. Todavia, esse método é complexo e requer padronização para a obtenção de filmes reprodutíveis em escala de laboratório. Filmes biomiméticos que se assemelham à estrutura líquido-cristalina encontrada para estruturas colagenosas *in vivo* têm sido obtidos com uso de bacteriófagos²¹⁴ e peptídeos anfifílicos²¹⁵, porém a formação de filmes com colágeno em sua estrutura nativa ainda é um desafio.

Além da criação de materiais com propriedades líquido-cristalinas, colágeno tipo I pode também ser estudado quanto à sua auto-organização espontânea em solução^{216,217} ou superfícies²¹⁸. As matrizes resultantes podem ser utilizadas como *scaffolds* bi e tridimensionais para células²¹⁹, recobrimentos biocompatíveis^{220,221}, modelagem de superfícies²²² e até mesmo como molde para a geração de nanofios de Si para aplicação em microeletrônica²²³. A auto-organização de moléculas de colágeno é um exemplo clássico de processo entrópico mediado pela perda de moléculas de solvente²²⁴. Em pH fisiológico, o equilíbrio entre ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas culmina na auto-organização de moléculas de colágeno tipo I em fibrilas com um específico padrão de estrias (67 nm)^{225,226}. A auto-organização de moléculas de colágeno tipo I sobre superfícies de mica (geralmente moscovita) tem sido extensamente estudada por microscopia de força atômica (AFM)^{227,228}. Esses estudos consistem na incubação de uma gota de solução de colágeno (com desejada concentração, pH e força iônica) sobre superfícies de mica por certo tempo (geralmente 10 min). Após incubação, a superfície é enxaguada com solução tampão nas mesmas condições sem a presença de colágeno de modo a remover moléculas fracamente adsorvidas. Nesses estudos, as moléculas de colágeno se auto-organizam sobre a superfície de mica dando origem a estruturas cuja morfologia é dependente do pH e composição iônica da solução tampão.

As matrizes assim formadas consistem de fibrilas de colágeno altamente orientadas, com espessura de aproximadamente 3 nm, que é o diâmetro médio de uma microfibrila nativa. Jiang et al²²⁹ estudaram a auto-organização de moléculas de colágeno sobre superfícies de mica com pH variando de 2,5 a 10,5. Nesse estudo, em condições onde o pH variou de 2,5 a 3,5, observou-se a adsorção de moléculas de colágeno sob a forma de glóbulos, devido à baixa tendência de auto-organização em fibrilas a baixos valores de pH²³⁰. Aumentando o pH de 4,5 a 8,9, observa-se a auto-organização das moléculas de colágeno em fibrilas, mas a densidade de fibrilas na superfície diminuiu em pH fortemente básico²²⁹. Além de mudanças ocasionadas pelo pH, nesse mesmo estudo observou-se que o tipo do eletrólito e a força iônica podem influenciar a morfologia da auto-organização de moléculas de colágeno em matrizes bidimensionais²¹⁸. Um interessante resultado observado nesses estudos é a possibilidade de que o íon K^+ possa interagir especificamente com as moléculas de colágeno e afetar o alinhamento das resultantes fibrilas²³¹. Além disso, observa-se que a presença de K^+ é fundamental para a auto-organização das moléculas de colágeno em fibrilas que exibam estrias periódicas de 67 nm sobre superfícies de mica²³², embora essa dependência não tenha sido observada para a auto-organização em solução²³³. A formação de fibrilas unidirecionalmente alinhadas sobre mica foi inicialmente atribuída ao fluxo hidrodinâmico causado durante a deposição da gota de solução sobre a superfície²²⁹. Todavia, atualmente é especulado que esse alinhado observado para as fibrilas auto-organizadas é quasi-epitaxial, induzido pela orientação cristalográfica da superfície de mica²³⁴. A auto-organização de moléculas de colágeno sobre mica ocorre por diferentes etapas: adsorção inicial das moléculas sobre a superfície, difusão, nucleação e crescimento das fibrilas, dando origem à uma matriz bidimensional. Uma vez que as primeiras fibrilas auto-organizadas estão suficientemente separadas, o alinhamento observado é provavelmente guiado pela rede cristalina da superfície de mica em detrimento de ser mediado pelas interações entre as fibrilas, dando suporte à hipótese de mecanismo de crescimento quasi-epitaxial²³⁴. A rede cristalina da superfície de mica controla a direção de crescimento das fibrilas durante a etapa de nucleação, enquanto o efeito da presença de K^+ pode estar relacionado à adsorção e difusão das moléculas através da neutralização da carga da superfície de mica²³⁵. Efeito de ânions na auto-organização de moléculas de colágeno sobre superfícies de mica também tem sido explorado. Wang et al²³⁶ observaram que em alta força iônica, ânions podem afetar drasticamente as interações entre as fibrilas e a superfície, resultando em

diferentes morfologias das matrizes finais. Fibrilas alinhadas paralelamente foram observadas na presença de acetato; fibrilas pequenas e espaçadas ao longo da superfície, organizadas em duas direções principais rotacionadas por 120° foram observadas na presença de sulfato e a formação de um filme liso com alguns defeitos foi observada na presença de cloreto²³⁶.

Visando obter filmes finos de fibrilas de colágeno altamente organizadas, nesse estudo foi explorado um processo de automontagem que não é diretamente dependente da superfície sólida, como o que ocorre para os filmes sobre mica descritos anteriormente. Esse método tem sido explorado para a automontagem de partículas vírus (fagos M13), que são monodispersas, são capazes de se auto-organizar e em solução, sob dadas condições, exibem propriedades líquido-cristalinas²³⁷. A automontagem dessas partículas consiste em emergir um suporte sólido mantido em solução contendo os fagos. Essa emergência é feita controlada e lentamente, de modo que a evaporação natural que surge no menisco entre o sólido e a solução faz com que se aumente a concentração de fagos na interface. O aumento de concentração faz com que transições líquido-cristalinas (TLC) ocorram na interface do menisco. Devido ao processo de emergência, forças competitivas irão atuar no menisco, como a tensão superficial e o atrito, que aliadas às TLC, controlam a deposição dos fagos hierarquicamente organizados sobre o suporte à medida em que ele é emergido, como esquematizado na figura 4.3. Devido à elevada organização estrutural das matrizes resultantes, essa metodologia tem sido utilizada para desenvolver materiais aplicáveis em sensores colorimétricos²³⁸, piezoelétricos²³⁹ e estudos de biomineralização²⁴⁰. Uma vez que o colágeno também exibe propriedades LC sob dadas condições, nessa dissertação estudou-se o processo de automontagem das fibrilas de colágeno por essa metodologia de emergência controlada, visando a aplicação em recobrimentos bioativos para superfícies metálicas.

Figura 4.3: Esquema do processo de automontagem através da emergência lenta e controlada de um suporte sólido mantido em uma solução contendo partículas capazes de se auto-organizar. Essa

metodologia resulta na deposição de filmes finos hierarquicamente organizados sobre o suporte sólido. Figura adaptada da referência ²³⁷.

2. Parte Experimental

2.1. Preparação da solução de colágeno

Solução de colágeno (97% tipo I e 3% tipo III) purificado e extraído a partir de couro de boi e solubilizado em HCl 0,01 mol L⁻¹, 3,0 mg/mL, foi obtida da Advanced Biomatrix (PureCol®, Lote 7112). A solução foi então diluída em tampão ácido cítrico/Na₂HPO₄ (50,0 mM, pH 2,6 – 7,4) ou tampão NaHCO₃/Na₂CO₃ (50,0 mM, pH 9.0). Os tampões utilizados continham a concentração necessária de NaCl ou KCl para se obter a solução diluída final com a desejada força iônica. Soluções com maior concentração de colágeno foram obtidas por diálise contra solução contendo 15% m/m de polietileno glicol (Fisher BioReagents, MW 7000-9000) e HCl 10 mM. A diálise foi realizada à temperatura ambiente até que a concentração necessária para a diluição no tampão de interesse fosse obtida, com o uso de membrana de éster de celulose (Spectrum Laboratories, 0,5-1,0 kD MWCO). A concentração final de colágeno após a diálise foi estimada por volume e por espectroscopia de absorção no UV-Vis, como mostrado na Figura 4.

Figura 4: Espectros de absorção no UV-Vis de soluções de colágeno em tampão ácido cítrico/Na₂HPO₄ (50 mmol L⁻¹, pH 4). A absorção máxima em 267 nm foi utilizada para construir a curva de calibração da absorbância em função da concentração de colágeno. Medidas de absorbância foram obtidas a 25°C com cubeta de quartzo de 1,00 cm cada lado.

2.2. Produção de filmes finos de colágeno tipo I

A deposição dos filmes finos foi realizada utilizando-se uma bomba de infusão (KDScientific, Holliston, MA, EUA, modelo KDS-270) adaptada para controlar a velocidade de emersão dos suportes imersos em solução contendo colágeno tipo I. O sistema foi mantido em ambiente fechado para evitar influência externa e os experimentos foram realizados a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $37 \pm 2\%$. Superfícies de silício oxidado foram utilizadas como substratos para a deposição dos filmes finos, previamente limpos em solução piranha (70% H_2SO_4 /30% H_2O_2).

Figura 5: Sistema caseiro para a deposição dos filmes finos constituído por uma bomba de infusão adaptada.

2.3. Caracterização da topografia das superfícies por microscopia de força atômica

O microscópio de força atômica MFP3D AFM (Asylum Research, Santa Barbara, CA, EUA) foi empregado para caracterizar a topografia das superfícies. Imagens foram obtidas em modo AC com o uso de um cantilever composto por silício revestido com alumínio (Tap150Al-G, BudgetSensors, Bulgaria) com frequência de ressonância de 150 kHz e constante de força 5 N/m. Imagens foram escaneadas a 0,5 Hz e com resolução de 512 pontos por linha. Imagens foram tratadas com o programa Gwyddion versão 2.47.

3. Resultados e Discussão

A deposição dos filmes finos de colágeno tipo I foi realizada através da emersão de superfícies de Si imersos em solução contendo 1,5 mg/mL de colágeno em pH 3. A velocidade de emersão foi controlada de 10 a 70 $\mu\text{m}/\text{min}$ e as estruturas resultantes desse processo foram caracterizadas por AFM, como mostram as imagens de topografia na Figura 4.6. O controle da velocidade de emersão levou à formação de diferentes estruturas sobre as superfícies de Si. Com a emersão realizada a 10 $\mu\text{m}/\text{min}$, as moléculas de colágeno se depositam sobre a superfície na forma de aglomerados, sem nenhum grau de organização ou formação de fibrilas. A transição entre aglomerados desorganizados para estruturas fibrilares dá-se próximo a 30 $\mu\text{m}/\text{min}$. A partir da emersão realizada a 10 $\mu\text{m}/\text{min}$, observa-se aglomerados com dimensão da ordem de 600 nm que evoluem para estruturas fibrilares com aproximadamente 100 nm de diâmetro quando os suportes foram emersos a 30 $\mu\text{m}/\text{min}$. A partir desse ponto, as estruturas evoluem para fibrilas com maior comprimento, preservando a dimensão de aproximadamente 100 nm, que é a dimensão encontrada em fibrilas nativas. Observa-se também que o alinhamento unidirecional das fibrilas é aumentado à medida que se aumenta a velocidade de emersão. Não se observa padrões longitudinais (espaçamento d) para as fibrilas auto-organizadas em pH 3.

Figura 4.6: Imagens de AFM das estruturas auto-organizadas de colágeno formadas a partir da emersão de suportes silício imersos em solução contendo 1,5 mg mL⁻¹ de colágeno, em pH = 3 e 100 mmol L⁻¹ de NaCl. A velocidade de emersão foi controlada de 10 a 70 $\mu\text{m}/\text{min}$.

O espaçamento e a orientação das fibrilas de colágeno auto-organizadas ao longo das superfícies de Ti foram identificadas por transformada de Fourier bidimensional (2D

FFT). Uma imagem de AFM, como as mostradas anteriormente, são compostas por um conjunto de pixels que representam a organização espacial (nesse caso a distribuição de alturas) das estruturas depositadas sobre as superfícies de Si. A conversão entre essa informação espacial para o domínio da frequência (que é matematicamente definido) é realizada pela aplicação de uma transformada de Fourier sobre a distribuição de pixels da imagem. A função gerada pela aplicação da 2D FFT descreve a taxa com a qual a intensidade dos pixels varia ao longo da imagem original. O resultado da aplicação da 2D FFT é um gráfico de frequências, como mostrados na Figura 4.7-B. Nesse gráfico, pixels de baixa frequência encontram-se posicionados na origem, ou centro do gráfico. Esses sinais de baixa frequência correspondem a domínios da imagem origem original com pixels de mesma intensidade, que são originados pela forma geral da imagem. Analogamente, sinais de alta frequência ficam posicionados nas periferias do gráfico de frequências e representam defeitos e ruídos presentes na imagem original. Se uma imagem com distribuição aleatória for processada por 2D FFT, o gráfico de frequência resultante exibirá um conjunto de pixels dispostos em um padrão simétrico e circular em torno da origem. Esta condição é observada para a película de colágeno montada a 10 $\mu\text{m}/\text{min}$, como mostrado na Figura 4.7-B. Se uma imagem contendo fibrilas alinhadas ao longo de uma dada direção for processada por 2D FFT, o gráfico de frequência resultante apresentará pixels concentrados ao longo de um eixo específico. A análise deste tipo de gráfico revela que os pixels de alta frequência que relatam o alinhamento serão preferencialmente dispostos em 90° em relação ao ângulo principal de orientação da fibra²⁴¹. Portanto, a orientação das fibrilas de colágeno auto-organizadas em velocidades de emersão superiores a 20 $\mu\text{m}/\text{min}$ é atestada pela aparência de dois domínios de pixels nas imagens de 2D FFT mostradas na Figura 4.7-B. Além disso, os domínios circulares estão mais definidos e espaçados à medida que a velocidade de emersão é aumentada, indicando que a orientação e o espaçamento entre as fibras são otimizados com maiores velocidades de emersão. O espaçamento entre as fibrilas é evidenciado pelo aumento na separação dos componentes de frequência mostrados na Figura 4.7-C.

Figura 4.7: A) Imagens de AFM das estruturas auto-organizadas de colágeno formadas em pH = 3,0. B) Gráficos de frequência obtidos a partir da aplicação de 2D FFT às imagens mostradas em (A) e as respectivas distribuições de frequência (C).

A orientação e o espaçamento das fibrilas auto-organizadas podem ser ainda caracterizados pela análise da distribuição de altura nas imagens de topografia obtidas por AFM. Conforme observado na Figura 4.8, o aumento da velocidade de emersão levou à formação de fibrilas com um diâmetro distribuído de forma mais homogênea ao longo da superfície, atestada pela largura média do diâmetro medida a meia altura máxima. O aumento na unidirecionalidade das fibrilas auto-organizadas orientadas sobre a superfícies também é evidenciado pela diminuição da rugosidade aritmética (R_a) enquanto a área superficial é aumentada devido à formação de fibras menos espessas.

Figura 4.8: (A) Imagens de topografia dos filmes formados pela auto-organização das moléculas de colágeno ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em $\text{pH} = 3,0$) com diferentes velocidades de emersão. (B) Perfil de distribuição de alturas extraído das imagens de AFM. (C) Valores de rugosidade aritmética média (Ra) e área superficial para os filmes gerados em diferentes velocidades de emersão.

Também investigamos a auto-organização das moléculas de colágeno em $\text{pH} 4,0$, como mostrado nas imagens de AFM (Figura 4.9). A transição de fase entre aglomerados para estruturas fibrilares de colágeno é observada para velocidades de emersão superiores a 30 μm/min , a partir da qual é notada a presença de fibrilas com comprimento da ordem de $\sim 100 \text{ nm}$. É observado certo grau de orientação ao longo da direção de emersão, porém não é tão bem definido quanto os filmes auto-organizados em $\text{pH} 3,0$.

Figura 4.9: Imagens de AFM das estruturas auto-organizadas de colágeno formadas a partir da emersão de suportes silício imersos em solução contendo 1,5 mg/mL de colágeno, em pH = 4,0 e 100 mmol L⁻¹ de NaCl. A velocidade de emersão foi controlada de 10 a 70 μm/min.

Para investigar a influência do pH na auto-organização das moléculas de colágeno, substratos de Si foram imersos em soluções de colágeno (pH 2,6 a 9,0) e emersos com velocidade de emersão igual a 30 μm/min. Neste experimento, a concentração de eletrólito na solução tampão foi mantida constante em 100 mmol L⁻¹ de NaCl. As imagens de topografia dos filmes resultantes obtidas por AFM (Figura 4.10) demonstram o efeito do pH na auto-organização do colágeno. De pH 2,6 a 4,0, observa-se a formação de estruturas fibrilares nas quais o formato fibrilar é mais pronunciado e bem definido com o aumento do pH. Em pH 7,4, as estruturas fibrilares ainda são observadas, mas de forma menos organizada. Em pH 9,0, o colágeno não se encontra auto-organizado em estruturas fibrilares, mas em um filme menos denso e desorganizado. Além da baixa tendência em auto-organização das moléculas de colágeno em baixos valores de pH²³⁰, observamos que em nossa metodologia a formação de estruturas fibrilares é prontamente formada em pH 2,6. O aumento do pH conduz à melhoria na morfologia da fibrilação, mas para condições de pH próximas a 9,0, observamos uma diminuição da densidade de fibrilas, enquanto não foi observada formação de fibrilas para pH 9,0. Este resultado está de acordo com a observação de Jiang et al²²⁹, onde o aumento do pH da solução tampão em direção ao pI do colágeno diminuiu a densidade de fibrilas de colágeno auto-organizadas sobre superfícies de mica. O pI do colágeno utilizado neste experimento (Purecol®) está entre pH 7 a 8, conforme informado pelo fabricante.

A fibrilogenese das moléculas de colágeno é um processo termodinamicamente controlado favorecido por interações hidrofóbicas²¹⁷. Quando o pH se aproxima ao pI, a carga superficial dos monómeros de colágeno é reduzida, o que minimiza a repulsão eletrostática e favorece a agregação de moléculas de colágeno. Em nossa metodologia, a agregação em solução das moléculas de colágeno em condições básicas de pH inibe o processo de acúmulo no menisco necessário para a auto-organização de fibrilas na superfície. Desta forma, o filme resultante tem uma baixa densidade de fibrilas de colágeno resultando em morfologia pouco fibrilar.

Figure 4.10: Imagens de AFM das estruturas auto-organizadas de colágeno produzidas pela emersão dos suportes de Si a 30 μm / min. A concentração de colágeno utilizada foi 1,5 mg/mL de colágeno, variando o pH e com 100 mmol L⁻¹ de NaCl.

Em seguida, investigamos a influência da força iônica na auto-organização das moléculas de colágeno em pH 4,0 e velocidade de emersão igual a 30 $\mu\text{m}/\text{min}$. Esse pH foi escolhido devido à formação de estruturas nativas, como será mostrado posteriormente. Observamos na Figura 4.11 que na ausência de NaCl, a morfologia fibrilar das estruturas formadas não é bem definida. Aumentando a concentração de NaCl até 100 mmol L^{-1} leva à auto-organização de estruturas fibrilares. Duplicando a concentração de NaCl para 200 mmol L^{-1} levou à formação de fibrilas mais longas e que tenderam a se co-alinharem ao longo da superfície. Em alta força iônica (300 mmol L^{-1} de NaCl), as moléculas de colágeno se auto-organizaram em estruturas mais espessas, porém com baixa definição fibrilar. Portanto, pode-se inferir que para um mesmo valor de pH, o aumento da força iônica equivale a aumentar a atração entre as moléculas de colágeno. Além disso, em alta força iônica pode ocorrer a formação de agregados em solução que são depositados sobre a superfície durante o processo de emersão. A agregação de monômeros de colágeno é controlada de forma significativa por interações eletrostáticas. Para discutir o efeito das interações eletrostáticas, a escala de comprimento sobre a qual ocorrem essas interações (comprimento de blindagem de Debye, κ^{-1}) deve ser levada em consideração. O comprimento de Debye é a distância característica sobre a qual o potencial eletrostático perto de uma entidade carregada decai, de acordo com a equação

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{e^2 N_A}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2 \right)^{1/2}$$

onde ϵ_r é a permissividade relativa (constante dielétrica) da solução, ϵ_0 é a permissividade do espaço livre, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, e é a carga elementar, N_A é o número da Avogadro, C_i é a concentração molar do íon i -ésimo (mol L^{-1}), e Z_i é o número de carga do íon i -ésimo. Usando esta equação, o comprimento Debye κ^{-1} de colágeno solúvel é reduzido de um máximo teórico de ~ 970 nm em água pura para aproximadamente 60 nm nas concentrações de NaCl utilizadas. A distância entre as superfícies de dois monômeros de colágeno determinada a partir de fibrilas de colágeno reconstituídas totalmente hidratadas é de aproximadamente 0,5 nm²³⁷, portanto, as interações eletrostáticas só se tornam importantes quando os monômeros são agregados para formar fibrilas, processo esse que é otimizado por uma certa concentração eletrolítica, diminuindo a repulsão e favorecendo a auto-organização das moléculas. Em

nosso estudo, observamos que a força iônica mantida em NaCl com concentração igual a 100 mmol L^{-1} é uma condição ótima para a obtenção de estruturas fibrilares alinhadas e bem definidas.

Figura 4.11: Imagens AFM de estruturas auto-organizadas de colágeno geradas pela emersão dos suportes de Si a 30 e 50 $\mu\text{m}/\text{min}$ a partir de soluções contendo 1,5 mg/mL de colágeno a pH 4,0 e com diferentes concentrações de NaCl.

Colágeno nativo exibe um espaçamento d característico de 67 nm ao longo das fibrilas. Portanto, avaliamos a presença de espaçamento d em nossos filmes auto-organizados de colágeno, como mostrado na Figura 4.12. Para as fibrilas auto-organizadas em pH 3, observa-se uma superfície completamente lisa, indicando que as moléculas de colágeno não se auto-organizaram em fibrilas que exibem o padrão nativo de estrias com 67 nm. No entanto, para pH 4 é possível identificar algum espaçamento periódico distribuído longitudinalmente ao longo das fibrilas, medindo aproximadamente 67 nm. Dessa forma, nossa abordagem para o desenvolvimento de filmes auto-organizados de colágeno é promissora, já que outros estudos de auto-organização em superfícies de mica, por exemplo, não observam espaçamento d em condições de baixo pH.

A influência da composição eletrolítica tem sido descrita como um fator determinante na auto-organização de moléculas de colágeno em fibrilas que mimetizam o espaçamento d observado em estruturas nativas. Em especial, estudos de auto-organização em superfícies de mica relatam que a presença de K^+ no meio é essencial para a obtenção do espaçamento d . Todavia, em nossa metodologia não foi observada nenhuma diferença devido à presença de K^+ no meio, como mostrado na figura 4.13. Isso nos indica que a auto-organização das moléculas de colágeno é controlada por outros parâmetros além da composição iônica, como discutiremos posteriormente.

Figura 4.12: Imagens AFM das fibrilas de colágeno auto-organizadas em pH 3,0 e 4,0 (1,5 mg/mL de colágeno, 100 mmol L⁻¹ de NaCl e velocidade de emersão igual a 40 μ m/min) para avaliar a presença de espaçamento d .

Figure 4.13: Imagens de AFM das fibrilas de colágeno auto-organizadas em pH 3,0 com 100 mmol L⁻¹ de NaCl ou KCl. A concentração de colágeno foi 1,5 mg/mL e velocidade de emersão igual a 30 ou 50 µm/min.

Finalmente, investigamos a influência da concentração de colágeno no processo de automontagem, como mostra as imagens de AFM na Figura 4.14. Em pH 4,0 e 100 mmol L⁻¹ de NaCl, observa-se que o aumento da concentração de colágeno de 1,5 para 6,0 mg/mL levou à formação de fibrilas com formato mais definido e resultou em filmes mais densos e mais alinhados em relação à direção de emersão. A transição de fase existente entre as velocidades de 10 a 30 µm/min é mais evidente para os filmes auto-organizados quando a concentração de colágeno é de 6 mg/mL. Para a solução contendo 6 mg/mL, quando a velocidade de emersão é de 10 µm/min, as moléculas de colágeno encontram-se auto-organizadas em fibrilas alinhadas em duas direções perpendiculares, que evoluem para fibrilas unidirecionalmente orientadas e com formato bem definido à medida que a velocidade de emersão aumenta. O espaçamento das fibrilas auto-organizadas a partir da solução com concentração de 6 mg/mL é mais evidente, indicando que a concentração de monômeros é um fator essencial para o controle da automontagem das fibrilas na interface sólido-líquido-ar.

Figura 4.14: Imagens AFM das estruturas auto-organizadas de colágeno a partir da emersão de suportes de Si imersos em soluções contendo 1,5 e 6,0 mg/mL de colágeno a pH 4,0 e 100 mmol L⁻¹ de NaCl.

Para concentrações de colágeno ainda maiores (10 mg/mL), em pH 4,0, como mostrado na Figura 4.15, observamos a presença de agregados nos filmes resultantes. Devido à alta concentração, a formação de agregados (ou mesmo de fibrilas) no interior

da solução é aumentada. Portanto, aglomerados de fibrilas são depositados na superfície durante o processo de montagem, conforme evidenciado pelas setas nas imagens AFM. Além disso, a formação de agregados na solução diminui a concentração de moléculas de colágeno no menisco entre o líquido e o suporte, exigindo assim um tempo maior o acúmulo de moléculas necessário à automontagem das fibrilas. Isso é evidenciado pela diminuição da rugosidade aritmética dos filmes resultantes à medida que a velocidade de emersão é aumentada. Em baixas velocidades, observamos a formação de feixes com fibrilas de colágeno desorganizadas. A largura desses feixes diminui à medida que se aumenta a velocidade de emersão. Vale ressaltar ainda que os filmes resultantes da automontagem em altas concentrações possuem fibrilas com espaçamento d mais pronunciado do que o observado em concentrações menores. Todavia, o grau de orientação unidirecional é inferior ao observado para menores concentrações.

Figure 4.15: Imagens de AFM das estruturas automontadas de colágeno em diferentes velocidades de emersão. A concentração de colágeno na solução foi de 10 mg/mL, em pH 4,0 e com 100 mmol L⁻¹ de NaCl. O gráfico mostra a rugosidade aritmética média (R_a) calculada para os filmes automontados em diferentes velocidades de emersão.

A fim de alcançar uma maior concentração de colágeno no menisco, mas evitando a agregação no interior da solução, realizamos o processo de emersão em velocidade muito lenta (1 $\mu\text{m}/\text{min}$) em soluções com baixa concentração de colágeno. A baixa taxa de emersão, a evaporação lenta do solvente no menisco leva ao acúmulo de moléculas de colágeno, permitindo assim a criação de fibrilas longas e interconectadas ao longo da superfície, conforme observado na Figura 4.16-A. A diminuição da concentração de

colágeno para 0,6 mg/mL leva à formação de fibrilas ainda mais longas e mais interconectadas, criando um complexo emaranhado de fibrilas ao longo da superfície. Observa-se também a presença de um padrão longitudinal de estrias ao longo das fibrilas. Estes resultados atestam que o controle cinético imposto pela velocidade de emersão é um importante parâmetro na determinação da estrutura das fibrilas.

Figura 4.16: Estruturas auto-organizadas formadas pela emersão dos suportes de Si (1 $\mu\text{m}/\text{min}$) a partir de soluções contendo 1,5 ou 0,6 mg/mL de colágeno, em pH 4,0 e com 100 mmol L⁻¹ de NaCl.

De modo a atestar a importância da nossa abordagem para a automontagem de filmes finos de colágeno, investigamos a ocorrência de auto-organização através do espalhamento de uma gota da solução de colágeno (nas mesmas condições) sobre a superfície de Si. Essa metodologia é a utilizada para a formação de filmes finos auto-organizados de colágeno sobre superfícies de mica²³⁵. O tempo de incubação da solução de colágeno (1,5 mg/mL, pH 4 e 100 mmol L⁻¹ de NaCl) sobre a superfície foi de 10 min. Após o tempo de incubação, a superfície foi lavada com a solução tampão nas mesmas condições sem a presença de colágeno (Figura 4.17-A) ou deixada evaporar à temperatura ambiente (Figura 4.17-B). Após a evaporação, não observamos presença de fibrilas auto-organizadas sobre a superfície, mas a formação de agregados sem organização ou morfologia definida. Após a lavagem, detectamos apenas alguns agregados na superfície, indicando que a adesão na superfície é fraca e não se observa auto-organização em estruturas fibrilares. Este resultado atesta que o processo de automontagem de colágeno aqui descrito pela nossa abordagem é promovido pelo controle cinético imposto pela evaporação controlada no menisco. Uma vez que as superfícies de silício são inertes, não observamos nenhuma auto-organização mediada

pela estrutura da superfície, como a induzida pelo sinergismo entre a rede cristalina e alta carga superficial de superfícies de mica²³⁵.

Figura 4.17: Imagens de AFM obtidas para as superfícies controle através do espalhamento de uma gota da solução de colágeno (pH 4.0, 100 mmol L⁻¹ NaCl) sobre a superfície de Si após enxague (A) e após evaporação (B).

Automontagem de monômeros em interfaces sob evaporação é um processo bem conhecido que ocorre na natureza e tem sido mimetizado para criar materiais com estruturas hierárquicas^{242–245}. H. Maeda²⁴² descreveu a formação de padrões espacialmente rítmicos a partir de gotas de solução de colágeno evaporantes, cuja morfologia mudou de acordo com a concentração de colágeno. O princípio básico que impulsiona a automontagem em linhas de evaporação (a superfície da gota ou do menisco) é chamado de efeito de "anel de café", parecido com a morfologia que surge quando uma gota de café é seca sobre uma superfície. Durante a secagem de uma gota séssil contendo macromoléculas ou suspensões de partículas coloidais, vários anéis concêntricos podem ser formados devido ao acúmulo de matéria na linha de evaporação e ao movimento repetitivo de deslizamento causado pela redução do volume na interface sólido-líquido-ar^{242–245}. A formação de estruturas hierárquicas nas linhas de evaporação é regida pela fixação da linha de contato, que se move devido à ação sinérgica das forças de fricção e capilaridade na interface. No entanto, em nosso sistema, a linha de contato no menisco não é estática devido ao movimento de emersão, todavia a velocidade de emersão é tão baixa que podemos considerar um processo evaporativo quase-estático. Quando de Si é colocado em contato com a solução de colágeno, um menisco é formado na interface líquido-vapor. À medida que o solvente evapora, o fluxo convectivo gerado no interior da solução faz com que moléculas se movam em direção à linha de contato, favorecendo o acúmulo de monômeros de colágeno na interface líquido-vapor. Esse acúmulo supera a barreira necessária para a nucleação e o crescimento das fibrilas de colágeno, que são então auto-organizadas no menisco e se depositam de forma orientada sobre a superfície

de silício. A orientação é governada pelo sinergismo entre a capilaridade e a força de atrito impulsionada pelo movimento de emersão que atuam no menisco. Este processo é esquematizado na Figura 4.18.

Figura 4.18: Representação do processo de automontagem de fibrilas de colágeno devido ao acúmulo de moléculas no menisco entre o sólido e o líquido. (a) Quando um suporte sólido é colocado em contato com a solução de colágeno, um menisco é formado na interface sólido-líquido-vapor: o equilíbrio entre as forças interfaciais que atuam no menisco é caracterizado pelo ângulo de contato (θ) naturalmente estabelecido entre o líquido e a superfície sólida. As forças que atuam no menisco são a tensão superficial do líquido (γ_{LV}), a energia livre de superfície (γ_{SV}) e a tensão interfacial entre o líquido e o sólido (γ_{SL}). (b) A evaporação do solvente no menisco leva ao acúmulo de moléculas de colágeno, enquanto que o fluxo convectivo conduz moléculas para se moverem em direção à linha de contato. (c) O acúmulo de moléculas de colágeno no menisco é o fator cinético que impulsiona a nucleação e o crescimento de fibrilas de colágeno. Então, as fibrilas automontadas são impostas às forças de fricção criadas pelo movimento de emersão que culmina na criação dos filmes hierárquicos de colágeno sobre as superfícies de Si (d).

Uma evidência da importância do controle cinético imposto pela evaporação controlada no menisco durante o processo de automontagem é a formação de fibrilas em pH tão baixo quanto 2,6. Mesmo que as fibrilas exibam uma morfologia lisa em pH 2,6 (que é melhorada em condições de pH mais elevadas), a auto-organização das moléculas de colágeno em estruturas fibrilares nessa condição não foi observada para outros estudos de auto-organização de colágeno em superfícies²¹⁸ ou em solução²¹⁷. Além disso, observamos que, em baixas velocidade de emersão, ocorre a formação de agregados ao invés de fibrilas bem definidas e separadas, mesmo em condições de pH onde se espera uma alta repulsão entre as moléculas de colágeno (pH ácido), confirmando que a automontagem é governada pela acumulação de moléculas no menisco. Ainda, o óxido

de silício possui baixa carga superficial e energia livre, indicando que a montagem não é induzida pela estrutura da superfície, como foi extensivamente estudado para superfícies de mica, onde a auto-organização é guiada epitaxialmente²³⁵. A baixa adesão e auto-organização obtidas para as amostras controle (figura 4.18) também atestam que a automontagem não é movida pela superfície de Si mas sim pelas forças competitivas que atuam no menisco.

4. Conclusões

Nesse capítulo, descrevemos uma abordagem nunca antes utilizada para a automontagem de fibrilas de colágeno sobre superfícies sólidas, dando origem a filmes com alto grau de organização estrutural. Esse processo de automontagem é governado pela evaporação controlada que surge no menisco entre o líquido e o suporte, que é emerso lentamente da solução contendo colágeno. Parâmetros como concentração, pH e força iônica controlam a organização e a estrutura fibrilar dos filmes finos resultantes. Futuramente, os filmes finos gerados por esse processo de automontagem serão mineralizados com cristais de HAp na presença de Sr^{2+} . A biomineralização desses filmes nos dará abertura para a criação de recobrimentos bioativos com alto grau de organização estrutural. Poucos estudos relatam na literatura a formação de recobrimentos baseados em colágeno onde as fibrilas estão hierarquicamente organizadas, revelando assim a importância da metodologia desenvolvida nessa dissertação. Essa metodologia é vantajosa em relação às outras descritas na literatura, como a bem consolidada auto-organização de fibrilas de colágeno induzida por superfícies de mica, uma vez que pode ser aplicada a diferentes tipos de superfícies. Além disso, é um método inspirado em fenômenos naturais e com o uso de equipamentos simples, o que traz enorme versatilidade à técnica. Uma vez que é uma metodologia governada por propriedades interfaciais, futuros experimentos precisam ser traçados visando entender o papel da energia livre de superfície do suporte sólido e da taxa de evaporação (controlada pela temperatura e umidade relativa) no processo de automontagem. Outro ponto promissor a ser explorado a partir dessa técnica de automontagem é o desenvolvimento de filmes finos de colágeno com estruturas líquido-cristalinas estabilizadas. Uma vez que a obtenção de estruturas líquido-cristalinas para o colágeno é descrita por ocorrer em condições específicas de pH e concentração, acreditamos que a manipulação da concentração e da composição iônica da solução de colágeno, aliada à temperatura e à presença de aditivos poderá dar a origem às transições líquido-cristalinas no menisco, que se propagam durante a deposição dos filmes automontados. A obtenção desses materiais é promissora e abre portas para aplicações diferenciadas, como sensores colorimétricos, biomineralização, propriedades piezoelétricas e engenharia de tecidos.

PERSPECTIVAS

Sobre os filmes híbridos contendo SrCO_3 e ou CaCO_3

Após a caracterização físico-química dos filmes híbridos descrita nessa dissertação, uma questão chave a ser respondida é a relação entre a quantidade liberada de íons Ca^{2+} e ou Sr^{2+} pelas matrizes e a resposta biológica obtida para os osteoblastos cultivados *in vitro*. A quantificação de Ca^{2+} e Sr^{2+} liberados pelos filmes híbridos no meio de cultivo dos osteoblastos, em diferentes tempos, será quantificada por espectrometria de absorção atômica. Outro ponto interessante a ser explorado é a biomineralização de HAp sobre esses filmes híbridos a partir da imersão em SBF. É necessário caracterizar a natureza da fase mineral precipitada acompanhando diferentes tempos de reação. Além disso, é preciso identificar se Sr^{2+} liberado a partir dos filmes híbridos pode ser incorporado nos cristais de HAp precipitados sobre as superfícies.

Sobre o complexo morina- Sr^{2+}

Uma vez que caracterizamos a estrutura química do complexo formado entre morina e Sr^{2+} , o próximo passo desse estudo é caracterizar sua atividade biológica. A atividade osteoblástica do complexo será avaliada em colaboração com o Prof. Dr. Pietro Ciancaglini. A atividade osteoclástica do complexo será avaliada em colaboração com a Profa. Dra. Sanda Yasuyo Fukada (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto). Quanto à formação do complexo morina- Sr^{2+} em monocamadas de Langmuir, é preciso compreender melhor a estrutura dos filmes formados. Informação estrutural das monocamadas poderá ser obtida com o uso da espectroscopia de absorção no infravermelho *in situ* em monocamadas de Langmuir (PM-IRRAS) em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Caseli (Unifesp – Diadema). Além disso, é necessário caracterizar as propriedades fotofísicas do complexo em filmes LB, de modo a obter informação acerca do ambiente em que está inserido e da sua fluorescência. Visando aplicar esses filmes LB como recobrimentos bioativos é preciso explorar a liberação de Sr^{2+} a partir dessas matrizes e o comportamento de osteoblastos cultivados sobre elas. Outro ponto importante a ser explorado é a estabilização dos filmes LB sobre as superfícies, de modo a desenvolver biomateriais robustos e de longa durabilidade, sem perda da organização estrutural característica dessas matrizes.

Filmes automontados de colágeno

A próxima etapa nesse estudo será a biomineralização das fibrilas de colágeno com cristais de HAp. Em especial, será estudada a incorporação de Sr^{2+} visando a obtenção de recobrimentos bioativos para superfícies metálicas. Além disso, essa metodologia de automontagem se mostra promissora para a criação de sistemas com organização líquido-cristalina. Filmes finos hierárquicos que mimetizem a organização das fibrilas de colágeno no tecido ósseo podem atuar como matrizes para estudos de processos de biomineralização, que será objeto do projeto de Doutorado do aluno.

Artigos publicados com a participação do aluno

1. **CRUZ, MARCOS A.E.**; DE SOUZA, RAFAEL MAGLIA; DIAS, LUIS GUSTAVO; RAMOS, ANA PAULA. *Counterion-mediated Ca^{2+} accumulation on cationic Langmuir-Blodgett films as template for CaCO_3 growth*. Thin Solid Films, v. 638, p. 433-440, 2017.
2. **CRUZ, MARCOS A. E.**; RUIZ, GILIA C.M.; FARIA, AMANDA N.; ZANCANELA, DANIELA C.; PEREIRA, LOURIVALDO S.; CIANCAGLINI, PIETRO; RAMOS, ANA P.. *Calcium carbonate hybrid coating promotes the formation of biomimetic hydroxyapatite on titanium surfaces*. Applied Surface Science, v. 370, p. 459-468, 2016.
3. **CRUZ, MARCOS A.E.**; RAMOS, A. P.. *Bioactive CaCO_3 /poly(acrylic acid)/chitosan hybrid coatings deposited on titanium*. Surface & Coatings Technology, p. 145-152, 2016.
4. RUIZ, GILIA C.M.; **CRUZ, MARCOS A.E.**; FARIA, AMANDA N.; ZANCANELA, DANIELA C.; CIANCAGLINI, PIETRO; RAMOS, ANA P.. *Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium*. Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems, v. 77, p. 102-110, 2017.
5. FARIA, AMANDA N.; **CRUZ, MARCOS A.E.**; RUIZ, GILIA C.M.; ZANCANELA, DANIELA C.; CIANCAGLINI, PIETRO; RAMOS, ANA P.. *Different compact hybrid LB-film coatings modify osteoblast growth and biomineralization*. Journal of Biomedical Materials Research, Part B Applied Biomaterials, Artigo aceito para publicação, 2017.
5. RAMOS, ANA P.; **CRUZ, MARCOS A. E.**; TOVANI, CAMILA B.; CIANCAGLINI, PIETRO. *Biomedical applications of nanotechnology*. Biophysical Reviews, v. 9, p. 79-89, 2017.
6. PATERLINI, THAIS T.; NOGUEIRA, LUCAS F. B.; TOVANI, CAMILA B.; **CRUZ, MARCOS A. E.**; DERRADI, RAFAEL; RAMOS, ANA P.. *The role played by modified bioinspired surfaces in interfacial properties of biomaterials*. BIOPHYSICAL REVIEWS, v.9, p. 683-698, 2017.
7. DE SOUZA, ISRAEL D.; **CRUZ, MARCOS A.E.**; DE FARIA, AMANDA N.; ZANCANELA, DANIELA C.; SIMÃO, ANA M.S.; CIANCAGLINI, PIETRO; RAMOS, ANA P.. *Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate- LB film as template*. COLLOIDS AND SURFACES B- BIOINTERFACES, v. 118, p. 31-40, 2014.

REFERÊNCIAS

1. Civantos, A. *et al.* Titanium Coatings and Surface Modifications: Toward Clinically Useful Bioactive Implants. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **3**, 1245–1261 (2017).
2. Geetha, M., Singh, A. K., Asokamani, R. & Gogia, A. K. Ti based biomaterials , the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Prog. Mater. Sci.* **54**, 397–425 (2009).
3. Elias, C. N., Lima, J. H. C., Valiev, R. & Meyers, M. A. Biomedical applications of titanium and its alloys. *JOM* **60**, 46–49 (2008).
4. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
5. Albrektsson, T., Brånemark, P., Hansson, H. & Lindström, J. Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man. *Acta Orthop.* **52**, 155–170 (1981).
6. Albrektsson, T. & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* **10 Suppl 2**, S96–101 (2001).
7. Puleo, D. A. & Nanci, A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* **20**, 2311–2321 (1999).
8. Boyan, B. D. *et al.* in *Titanium in medicine* 561–585 (Springer-Verlag, 2001).
9. Davies, J. E. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* **28**, 5058–5067 (2007).
10. Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I. & Percy, M. J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng.* **11**, 1–18 (2005).
11. Mulari, M. T. K., Qu, Q., Harkonen, P. L. & Vaananen, H. K. Osteoblast-like Cells Complete Osteoclastic Bone Resorption and Form New Mineralized Bone Matrix In Vitro. *Calcif. Tissue Int.* **75**, 253–261 (2004).
12. Civantos, A. *et al.* Titanium Coatings and Surface Modifications: Toward Clinically Useful Bioactive Implants. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **3**, 1245–1261 (2017).
13. Coelho, P. G., Jimbo, R., Tovar, N. & Bonfante, E. A. Osseointegration: Hierarchical designing encompassing the micrometer, micrometer, and nanometer length scales. *Dent. Mater.* **31**, 37–52 (2015).
14. Geetha, M., Singh, a. K., Asokamani, R. & Gogia, a. K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Prog. Mater. Sci.* **54**, 397–425 (2009).
15. Deligianni, D. D., Katsala, N. D., Koutsoukos, P. G. & Missirlis, Y. F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* **22**, 87–96 (2001).
16. Wennerberg, A. & Albrektsson, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* **20 Suppl 4**, 172–84 (2009).
17. Wennerberg, A., Hallgren, C., Johansson, C. & Danelli, S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin. Oral Implants Res.* **9**, 11–19 (1998).
18. Sato, M., Slamovich, E. B. & Webster, T. J. Enhanced osteoblast adhesion on hydrothermally treated hydroxyapatite/titania/poly(lactide-co-glycolide) sol-gel titanium coatings. *Biomaterials* **26**, 1349–57 (2005).
19. Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W. & Bizios, R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 475–83 (2000).
20. Lampin, M., Warocquier-Clérout, Legris, C., Degrange, M. & Sigot-Luizard, M. F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J. Biomed. Mater. Res.* **36**, 99–108 (1997).
21. Anselme, K. *et al.* Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J. Biomed. Mater. Res.* **49**, 155–66 (2000).
22. Jayaraman, M., Meyer, U., Bühner, M., Joos, U. & Wiesmann, H.-P. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* **25**, 625–631 (2004).
23. Riehle, M. O., Dalby, M. J., Johnstone, H., MacIntosh, A. & Affrossman, S. Cell

- behaviour of rat calvaria bone cells on surfaces with random nanometric features. *Mater. Sci. Eng. C* **23**, 337–340 (2003).
24. Webster, T. J. & Ejiofor, J. U. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* **25**, 4731–9 (2004).
 25. Khang, D. *et al.* Role of subnano-, nano- and submicron-surface features on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **33**, 5997–6007 (2012).
 26. de Oliveira, P. T., Zalzal, S. F., Beloti, M. M., Rosa, A. L. & Nanci, A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **80A**, 554–564 (2007).
 27. Gittens, R. *a et al.* The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater.* **9**, 6268–77 (2013).
 28. D'Sa, R. A., Raj, J., Dickinson, P. J., McCabe, F. & Meenan, B. J. Human Fetal Osteoblast Response on Poly(Methyl Methacrylate)/Polystyrene Demixed Thin Film Blends: Surface Chemistry Vs Topography Effects. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 14920–14931 (2016).
 29. Olivares-Navarrete, R. *et al.* Integrin $\alpha 2 \beta 1$ plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15767–72 (2008).
 30. Quéré, D. Wetting and Roughness. *Annu. Rev. Mater. Res.* **38**, 71–99 (2008).
 31. Menzies, K. L. & Jones, L. The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optom. Vis. Sci.* **87**, 387–99 (2010).
 32. Berg, J. M., Eriksson, L. G. T., Claesson, P. M. & Borge, K. G. N. Three-Component Langmuir-Blodgett Films with a Controllable Degree of Polarity. *Langmuir* **10**, 1225–1234 (1994).
 33. Vogler, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **74**, 69–117 (1998).
 34. Kwok, D. Y. & Neumann, A. W. *Contact angle measurement and contact angle interpretation. Advances in Colloid and Interface Science* **81**, (1999).
 35. Tirrell, M., Kokkoli, E. & Biesalski, M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surf. Sci.* **500**, 61–83 (2002).
 36. Arima, Y. & Iwata, H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* **28**, 3074–82 (2007).
 37. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **21**, 667–81 (2000).
 38. Hendesi, H., Barbe, M. F., Safadi, F. F., Monroy, M. A. & Popoff, S. N. Integrin mediated adhesion of osteoblasts to connective tissue growth factor (CTGF/ CCN2) induces cytoskeleton reorganization and cell differentiation. *PLoS One* **10**, 1–20 (2015).
 39. Lim, J. Y., Taylor, A. F., Li, Z., Vogler, E. a & Donahue, H. J. Integrin Expression and Osteopontin Regulation in Human Fetal Osteoblastic Cells Mediated by Substratum Surface Characteristics. *Tissue Eng.* **11**, 19–29 (2005).
 40. Faucheux, N., Schweiss, R., Lützw, K., Werner, C. & Groth, T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* **25**, 2721–30 (2004).
 41. Hotchkiss, K. M. *et al.* Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta Biomater.* **31**, 425–434 (2016).
 42. Clark, A. E., Hensch, L. L. & Paschall, H. A. The influence of surface chemistry on implant interface histology: a theoretical basis for implant materials selection. *J. Biomed. Mater. Res.* **10**, 161–74 (1976).
 43. Krajewski, A., Piancastelli, A. & Malavolti, R. Albumin adhesion on ceramics and correlation with their Z -potential. *Biomaterials* **19**, 4–8 (1998).
 44. Wilson, C. J., Clegg, R. E., Leavesley, D. I. & Percy, M. J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng.* **11**, 1–18 (2005).
 45. Cai, K., Rechtenbach, A., Hao, J., Bossert, J. & Jandt, K. D. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell

- behaviour aspects. *Biomaterials* **26**, 5960–71 (2005).
46. Zhang, J. *et al.* Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid. *Biomaterials* **26**, 3353–61 (2005).
 47. Zreiqat, H. *et al.* The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signalling pathways in human osteoblasts. *Biomaterials* **26**, 7579–86 (2005).
 48. Habibovic, P., Barre, F., Blitterswijk, C. A. Van & Groot, K. De. Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants. *J. Am. Ceram. Soc.* **85**, 517–522 (2002).
 49. Kokubo, T. Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process. *Mater. Sci. Eng. C* **25**, 97–104 (2005).
 50. Morra, M. *et al.* Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* **24**, 4639–4654 (2003).
 51. Rammelt, S. *et al.* Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* **27**, 5561–71 (2006).
 52. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, A., Haas, N. P. & Raschke, M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J. Biomed. Mater. Res.* **58**, 449–455 (2001).
 53. Ferris, D. M. *et al.* RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials* **20**, 2323–31 (1999).
 54. Available at: <https://infograph.venngage.com/p/185921/bone-project>. (Accessed: 13th November 2017)
 55. Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O. & Vaage, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **22**, 95–106 (2016).
 56. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–17 (2015).
 57. Boskey, A. L. & Roy, R. Cell culture systems for studies of bone and tooth mineralization. *Chem. Rev.* **108**, 4716–4733 (2008).
 58. Cooper, L. F., Masuda, T., Yliheikkilä, P. K. & Felton, D. a. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **13**, 163–174 (1998).
 59. Stein, G. S., Lian, J. B. & Owen, T. A. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *Faseb* **4**, 3111–3123 (1990).
 60. Ghazanfari, S., Khademhosseini, A. & Smit, T. H. Mechanisms of lamellar collagen formation in connective tissues. *Biomaterials* **97**, 74–84 (2016).
 61. Nudelman, F. *et al.* The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat. Mater.* **9**, 1004–9 (2010).
 62. Wang, Y. *et al.* The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat. Mater.* **11**, 724–733 (2012).
 63. Olszta, M. J. *et al.* Bone structure and formation: A new perspective. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **58**, 77–116 (2007).
 64. Robinson, R. A. & Watson, M. L. Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope. *Anat. Rec.* **114**, 383–409 (1952).
 65. Fratzl, P., Gupta, H. S., Paschalis, E. P. & Roschger, P. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *J. Mater. Chem.* **14**, 2115–2123 (2004).
 66. Sherman, V. R., Yang, W. & Meyers, M. A. The materials science of collagen. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **52**, 22–50 (2015).
 67. Ali, S. Y., Sajdera, S. W. & Anderson, H. C. Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **67**, 1513–20 (1970).
 68. Bolean, M. *et al.* Biophysical aspects of biomineralization. *Biophys. Rev.* **9**, 747–760 (2017).
 69. Golub, E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1790**, 1592–1598 (2009).
 70. Millán, J. L. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif.*

- Tissue Int.* **93**, 299–306 (2013).
71. Millán, J. L. in *Mammalian Alkaline Phosphatases* 1–2 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006). doi:10.1002/3527608060.ch
 72. Wuthier, R. E. & Lipscomb, G. F. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. *Front. Biosci. (Landmark Ed.* **16**, 2812–902 (2011).
 73. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **27**, 2907–15 (2006).
 74. Weng, J., Liu, Q., Wolke, J. G., Zhang, X. & de Groot, K. Formation and characteristics of the apatite layer on plasma-sprayed hydroxyapatite coatings in simulated body fluid. *Biomaterials* **18**, 1027–1035 (1997).
 75. Kim, H.-W., Koh, Y.-H., Li, L.-H., Lee, S. & Kim, H.-E. Hydroxyapatite coating on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol–gel method. *Biomaterials* **25**, 2533–2538 (2004).
 76. Peng, P. *et al.* Thin calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition in modified simulated body fluid. *J. Biomed. Mater. Res. A* **76**, 347–55 (2006).
 77. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. & Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 721–734 (1990).
 78. Chou, Y.-F., Huang, W., Dunn, J. C. Y., Miller, T. a & Wu, B. M. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. *Biomaterials* **26**, 285–95 (2005).
 79. Surmenev, R. a. A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication. *Surf. Coatings Technol.* **206**, 2035–2056 (2011).
 80. Kokubo, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* **12**, 155–163 (1991).
 81. Barrère, F. *et al.* Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **67**, 655–65 (2003).
 82. Hott, M., Noel, B., Bernache-assolant, D., Rey, C. & Marie, P. J. Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. *Hum. Osteoblast Differ.* 508–516 (1996).
 83. Bongio, M., van den Beucken, J. J. J. P., Leeuwenburgh, S. C. G. & Jansen, J. a. Development of bone substitute materials: from ‘biocompatible’ to ‘instructive’. *J. Mater. Chem.* **20**, 8747 (2010).
 84. Sanchez, C., Arribart, H. & Guille, M. M. G. Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems. *Nat. Mater.* **4**, 277–288 (2005).
 85. de Souza, I. D. *et al.* Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate-LB film as template. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **118**, 31–40 (2014).
 86. Ruiz, G. C. M. *et al.* Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium. *Mater. Sci. Eng. C* **77**, 102–110 (2017).
 87. Yukna, R. A. & Yukna, C. N. A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (Biocoral™) bone replacement grafts in infrabony defects*. *J. Clin. Periodontol.* **25**, 1036–1040 (1998).
 88. Piattelli, a., Podda, G. & Scarano, a. Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. *Biomaterials* **18**, 623–627 (1997).
 89. Fujihara, K., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials* **26**, 4139–47 (2005).
 90. Yao, H.-B., Ge, J., Mao, L.-B., Yan, Y.-X. & Yu, S.-H. 25th anniversary article: Artificial carbonate nanocrystals and layered structural nanocomposites inspired by nacre: synthesis, fabrication and applications. *Adv. Mater.* **26**, 163–87 (2014).
 91. Colfen, H. Precipitation of carbonates: recent progress in controlled production of complex shapes. **8**, 23–31 (2003).
 92. Maher, M. *et al.* Calcitic microlenses as part of the photoreceptor system in brittlestars.

- 819–822 (2001).
93. Aizenberg, J. Crystallization in Patterns: A Bio-Inspired Approach. *Adv. Mater.* **16**, 1295–1302 (2004).
 94. Meldrum, F. C. Calcium carbonate in biomineralisation and biomimetic chemistry. *Int. Mater. Rev.* **48**, 187–224 (2003).
 95. Braye, F. *et al.* Resorption kinetics of osseous substitute: natural coral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials* **17**, 1345–50 (1996).
 96. Fricain, J. C., Bareille, R., Ulysse, F., Dupuy, B. & Amedee, J. Evaluation of proliferation and protein expression of human bone marrow cells cultured on coral crystallized in the aragonite of calcite form. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 96–102 (1998).
 97. Abramovitch-Gottlib, L., Geresh, S. & Vago, R. Biofabricated Marine Hydrozoan: A Bioactive Crystalline Material Promoting Ossification of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng.* **12**, 729–739 (2006).
 98. Wang, X.-X., Xie, L. & Wang, R. Biological fabrication of nacreous coating on titanium dental implant. *Biomaterials* **26**, 6229–6232 (2005).
 99. Guo, Y. P. & Zhou, Y. Nacre coatings deposited by electrophoresis on Ti6Al4V substrates. *Surf. Coatings Technol.* **201**, 7505–7512 (2007).
 100. Liu, Y. *et al.* Evaluation of the attachment, proliferation, and differentiation of osteoblast on a calcium carbonate coating on titanium surface. *Mater. Sci. Eng. C* **31**, 1055–1061 (2011).
 101. Ramos, A. P., Nobre, T. M., Montoro, L. A. & Zaniquelli, M. E. D. Calcium carbonate particle growth depending on coupling among adjacent layers in hybrid LB/LbL films. *J. Phys. Chem. B* **112**, 14648–14654 (2008).
 102. Cruz, M. A. E. *et al.* Calcium carbonate hybrid coating promotes the formation of biomimetic hydroxyapatite on titanium surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **370**, 459–468 (2016).
 103. Cruz, M. A. E. & Ramos, A. P. Bioactive CaCO₃/poly(acrylic acid)/chitosan hybrid coatings deposited on titanium. *Surf. Coatings Technol.* **294**, 145–152 (2016).
 104. Ramos, A. P., Doro, F. G., Tfouni, E., Gonçalves, R. R. & Zaniquelli, M. E. D. Surface modification of metals by calcium carbonate thin films on a layer-by-layer polyelectrolyte matrix. *Thin Solid Films* **516**, 3256–3262 (2008).
 105. Rachner, T. D., Khosla, S. & Hofbauer, L. C. Osteoporosis: now and the future. *Lancet* **377**, 1276–87 (2011).
 106. Saidak, Z. & Marie, P. J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacol. Ther.* **136**, 216–226 (2012).
 107. Gentleman, E. *et al.* The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials* **31**, 3949–56 (2010).
 108. Yang, F. *et al.* Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem Cells* **29**, 981–91 (2011).
 109. Marie, P. J. Optimizing bone metabolism in osteoporosis: insight into the pharmacologic profile of strontium ranelate. *Osteoporos. Int.* **14 Suppl 3**, S9–12 (2003).
 110. Caverzasio, J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. *Bone* **42**, 1131–6 (2008).
 111. Canalis, E., Hott, M., Deloffre, P., Tsouderos, Y. & Marie, P. J. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone* **18**, 517–523 (1996).
 112. Grynblas, M. D. *et al.* Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect. *Bone* **18**, 253–259 (1996).
 113. Reginster, J. Y. *et al.* Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 2816–22 (2005).
 114. Marie, P. J. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone* **38**, S10–4 (2006).
 115. Marie, P. J. Effective doses for strontium ranelate. *Osteoporos. Int.* **19**, 1813; author reply 1815–7 (2008).

116. Li, Y. *et al.* The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats. *Biomaterials* **31**, 9006–9014 (2010).
117. Landi, E. *et al.* Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. *Acta Biomater.* **3**, 961–9 (2007).
118. Guo, D., Xu, K., Zhao, X. & Han, Y. Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement. *Biomaterials* **26**, 4073–83 (2005).
119. Lu, Y., Tan, L., Zhang, B., Lin, J. & Yang, K. Synthesis and characterization of Ca–Sr–P coating on pure magnesium for biomedical application. *Ceram. Int.* **40**, 4559–4565 (2014).
120. Sillassen, M. *et al.* Controlled Sr release from Ti–Sr–O films deposited by non-reactive magnetron sputtering in an industrial setup. *Surf. Coat. Technol.* **252**, 56–63 (2014).
121. Park, J.-W., Kim, Y.-J., Jang, J.-H. & Suh, J.-Y. Surface characteristics and primary bone marrow stromal cell response of a nanostructured strontium-containing oxide layer produced on a microrough titanium surface. *J. Biomed. Mater. Res. A* **100**, 1477–87 (2012).
122. Zhao, L. *et al.* The osteogenic activity of strontium loaded titania nanotube arrays on titanium substrates. *Biomaterials* **34**, 19–29 (2013).
123. Xin, Y., Jiang, J., Huo, K., Hu, T. & Chu, P. K. Bioactive SrTiO₃ nanotube arrays: strontium delivery platform on Ti-based osteoporotic bone implants. *ACS Nano* **3**, 3228–34 (2009).
124. Uskoković, V. & Uskoković, D. P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **96**, 152–91 (2011).
125. Bracci, B. *et al.* Effect of Mg⁽²⁺⁾, Sr⁽²⁺⁾, and Mn⁽²⁺⁾ on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1666–74 (2009).
126. Xue, W. *et al.* Preparation and cell–materials interactions of plasma sprayed strontium-containing hydroxyapatite coating. *Surf. Coatings Technol.* **201**, 4685–4693 (2007).
127. Oliveira, A. L., Reis, R. L. & Li, P. Strontium-substituted apatite coating grown on Ti6Al4V substrate through biomimetic synthesis. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **83**, 258–65 (2007).
128. Yamaguchi, S., Nath, S., Matsushita, T. & Kokubo, T. Controlled release of strontium ions from a bioactive Ti metal with a Ca-enriched surface layer. *Acta Biomater.* **10**, 2282–9 (2014).
129. Christoffersen, J., Christoffersen, M. R., Kolthoff, N. & Bärenholdt, O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone* **20**, 47–54 (1997).
130. Qiu, K., Zhao, X. J., Wan, C. X., Zhao, C. S. & Chen, Y. W. Effect of strontium ions on the growth of ROS17/2.8 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds. *Biomaterials* **27**, 1277–86 (2006).
131. Li, Y. W. *et al.* A novel injectable bioactive bone cement for spinal surgery: a developmental and preclinical study. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 164–70 (2000).
132. Wong, C. T. *et al.* In vivo cancellous bone remodeling on a strontium-containing hydroxyapatite (sr-HA) bioactive cement. *J. Biomed. Mater. Res. A* **68**, 513–21 (2004).
133. Schumacher, M., Henß, A., Rohnke, M. & Gelinsky, M. A novel and easy-to-prepare strontium (II) modified calcium phosphate bone cement with enhanced mechanical properties. *Acta Biomater.* **9**, 7536–7544 (2013).
134. Tian, A. *et al.* Osteoblast response to titanium surfaces coated with strontium ranelate-loaded chitosan film. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **29**, 1446–53 (2014).
135. Langmuir, I. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART II. LIQUIDS. *J. Am. Chem. Soc.* 1848–1906 (1917).
136. Brezesinski, G. & Möhwald, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **100–102**, 563–584 (2003).
137. Nichols-Smith, S., Teh, S.-Y. & Kuhl, T. L. Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1663**, 82–8 (2004).
138. Cavalli, A., Dynarowicz-Łątka, P., Oliveira Jr, O. & Feitosa, E. Using an effective

- surface charge to explain surface potentials of Langmuir monolayers from dialkyldimethylammonium halides with the Gouy–Chapman theory. *Chem. Phys. Lett.* **338**, 88–94 (2001).
139. Claesson, P., Carmona-Ribeiro, A. M. & Kurihara, K. Dihexadecyl phosphate monolayers: intralayer and interlayer interactions. *J. Phys. Chem.* **93**, 917–922 (1989).
 140. Sankaranarayanan, K., Dhathathreyan, A. & Miller, R. Assembling fibrinogen at air/water and solid/liquid interfaces using Langmuir and Langmuir-Blodgett films. *J. Phys. Chem. B* **114**, 8067–75 (2010).
 141. Hac-Wydro, K., Kapusta, J., Jagoda, A., Wydro, P. & Dynarowicz-Łatka, P. The influence of phospholipid structure on the interactions with nystatin, a polyene antifungal antibiotic A Langmuir monolayer study. *Chem. Phys. Lipids* **150**, 125–35 (2007).
 142. Ruiz, G. C. M. *et al.* Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium. *Mater. Sci. Eng. C* (2016).
 143. Cruz, M. A. E., de Souza, R. M., Dias, L. G. & Ramos, A. P. Counterion-mediated Ca^{2+} accumulation on cationic Langmuir-Blodgett films as template for CaCO_3 growth. *Thin Solid Films* **638**, 433–440 (2017).
 144. Mann, S. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry. *Nature* **365**, 499–505 (1993).
 145. Xu, A.-W., Ma, Y. & Colfen, H. Biomimetic mineralization. *J. Mater. Chem.* **17**, 415 (2007).
 146. Wucher, B., Yue, W., Kulak, A. N. & Meldrum, F. C. Designer Crystals: Single Crystals with Complex Morphologies. *Chem. Mater.* **19**, 1111–1119 (2007).
 147. Albeck, S., Aizenberg, J., Addadi, L. & Weiner, S. Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11691–11697 (1993).
 148. Weiner, S. & Addadi, L. Acidic macromolecules of mineralized tissues: The controllers of crystal formation. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 252–256 (1991).
 149. Cölfen, H. & Mann, S. Higher-order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 2350–65 (2003).
 150. Downs, R. T. & Hall-Wallace, M. The American Mineralogist Crystal Structure Database. 247–250 (2003).
 151. Owens, D. K. & Wendt, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **13**, 1741–1747 (1969).
 152. Kaelble, D. H. Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids. *J. Adhes.* **2**, 66–81 (1970).
 153. Maniopoulos, C., Sodek, J. & Melcher, a H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* **254**, 317–330 (1988).
 154. de Faria, A. N., Zancanela, D. C., Ramos, A. P., Torqueti, M. R. & Ciancaglini, P. Estrogen and phenol red free medium for osteoblast culture: study of the mineralization ability. *Cytotechnology* (2015). doi:10.1007/s10616-015-9844-2
 155. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
 156. Camolezi, F. L., Daghestanli, K. R. P., Magalhães, P. P., Pizauro, J. M. & Ciancaglini, P. Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: A tool for biomineralization study. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1091–1101 (2002).
 157. Gregory, C. a., Gunn, W. G., Peister, A. & Prockop, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* **329**, 77–84 (2004).
 158. Shi, Z., Huang, X., Cai, Y., Tang, R. & Yang, D. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. *Acta Biomater.* **5**, 338–345 (2009).
 159. Jr., H. E. R. & Cook, H. Dm. films of mixtures: I. S. acid with isostearic acid and with tri-p-cresyl phosphate. C. of components with octadecylphosphonic acid and with tri-o-xenyl phosphate. Monomolecular films of mixtures: I. Stearic acid with isostearic acid and with tri-p-cresyl phosphate. Comparison of components with octadecylphosphonic acid and

- with tri-o-xenyl phosphate. *J. Colloid Sci.* **9**, 535–546 (1954).
160. Woodward, J. T., Ulman, A. & Schwartz, D. K. Self-Assembled Monolayer Growth of Octadecylphosphonic Acid on Mica. **7463**, 3626–3629 (1996).
 161. Deamer, D. W., Meek, D. W. & Cornwell, D. G. Properties, composition, and structure of stearic acid-stearate monolayers on alkaline earth solutions. *J. Lipid Res.* **8**, 255–263 (1967).
 162. Davies, J. T. & Rideal, E. K. in *Interfacial Phenomena* 217–278 (Academic Press, 1963).
 163. Gericke, A. & Hühnerfuss, H. The effect of cations on the order of saturated fatty acid monolayers at the air-water interface as determined by infrared reflection-absorption spectrometry. *Thin Solid Films* **245**, 74–82 (1994).
 164. Pacchioni, G., Sousa, C., Illas, F., Parmigiani, F. & Bagus, P. S. Measures of ionicity of alkaline-earth oxides from the analysis of ab initio cluster wave functions. *Phys. Rev. B* **48**, 11573–11582 (1993).
 165. Simon-Kutscher, J., Gericke, A. & Hühnerfuss, H. Effect of Bivalent Ba, Cu, Ni, and Zn Cations on the Structure of Octadecanoic Acid Monolayers at the Air–Water Interface As Determined by External Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy. *Langmuir* **12**, 1027–1034 (1996).
 166. Andersen, F. A. & Brecevic, L. Infrared spectra of amorphous and crystalline calcium carbonate. *Acta Chem. Scand.* **45**, 1018–1024 (1991).
 167. Guo, Y. P. & Zhou, Y. Conversion of nacre powders to apatite in phosphate buffer solutions at low temperatures. *Mater. Chem. Phys.* **106**, 88–94 (2007).
 168. Lushtinetz, R., Seifert, G., Jaehne, E. & Adler, H.-J. P. Infrared Spectra of Alkylphosphonic Acid Bound to Aluminium Surfaces. *Macromol. Symp.* **254**, 248–253 (2007).
 169. Fowler, B. O., Moreno, E. C. & Brown, W. E. Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate. *Arch. Oral Biol.* **11**, 477–492 (1966).
 170. Siegel, F. R. The effect of strontium on the aragonite-calcite ratios of Pleistocene corals. *J. Sediment. Res.* **30**, 297–304 (1960).
 171. Soldati, A. L., Jacob, D. E., Glatzel, P., Swarbrick, J. C. & Geck, J. Element substitution by living organisms: the case of manganese in mollusc shell aragonite. *Sci. Rep.* **6**, 22514 (2016).
 172. Antonakos, A., Liarokapis, E. & Leventouri, T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials* **28**, 3043–54 (2007).
 173. Koutsopoulos, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *J. Biomed. Mater. Res.* **62**, 600–12 (2002).
 174. Gentleman, M. M. & Gentleman, E. The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions. *Int. Mater. Rev.* **59**, 417–429 (2014).
 175. Michiardi, A., Aparicio, C., Ratner, B. D., Planell, J. a. & Gil, J. The influence of surface energy on competitive protein adsorption on oxidized NiTi surfaces. *Biomaterials* **28**, 586–594 (2007).
 176. Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, a I. & Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* **64**, 295–312 (1997).
 177. Nayab, S. N., Jones, F. H. & Olsen, I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. *Biomaterials* **26**, 4717–27 (2005).
 178. Maeno, S. *et al.* The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* **26**, 4847–4855 (2005).
 179. Sul, Y.-T., Byon, E. & Jeong, Y. Biomechanical measurements of calcium-incorporated oxidized implants in rabbit bone: effect of calcium surface chemistry of a novel implant. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **6**, 101–110 (2004).
 180. Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* **561**, 3–12 (2014).
 181. Lawler, J. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and

- integrin receptors. *J. Cell Biol.* **107**, 2351–2361 (1988).
182. Hoylaerts, M. F. *et al.* Functional Significance of Calcium Binding to Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. *PLoS One* **10**, e0119874 (2015).
183. de Faria, A. N. *et al.* Different compact hybrid LB-film coatings modify osteoblast growth and biomineralization. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B* (2017) Artigo aceito para publicação.
184. Bertazzo, S. *et al.* Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **78**, 177–184 (2010).
185. Silverman, S. & Christiansen, C. Individualizing osteoporosis therapy. *Osteoporos. Int.* **23**, 797–809 (2012).
186. Rojo, L. *et al.* The synthesis and characterisation of strontium and calcium folates with potential osteogenic activity. *J. Mater. Chem. B* **3**, 2708–2713 (2015).
187. Martin-del-Campo, M. *et al.* Strontium folate loaded biohybrid scaffolds seeded with dental pulp stem cells induce in vivo bone regeneration in critical sized defects. *Biomater. Sci.* **4**, 1596–1604 (2016).
188. Harborne, J. B. & Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481–504 (2000).
189. Malesev, D. & Kuntic, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serbian Chem. Soc.* **72**, 921–939 (2007).
190. Gutierrez, A. C. & Gehlen, M. H. Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al³⁺. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **58**, 83–89 (2002).
191. Panhwar, Q. K. & Memon, S. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial properties of morin complexes. *J. Coord. Chem.* **64**, 2117–2129 (2011).
192. Woźnicka, E., Kopacz, M., Umbreit, M. & Kłos, J. New complexes of La(III), Ce(III), Pr(III), Nd(III), Sm(III), Eu(III) and Gd(III) ions with morin. *J. Inorg. Biochem.* **101**, 774–782 (2007).
193. Höfener, S., Kooijman, P. C., Groen, J., Ariese, F. & Visscher, L. Fluorescence behavior of (selected) flavonols: a combined experimental and computational study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 12572 (2013).
194. Malesev, D. & Kuntic, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serbian Chem. Soc.* **72**, 921–939 (2007).
195. Panhwar, Q. K., Memon, S. & Bhanger, M. I. Synthesis, characterization, spectroscopic and antioxidation studies of Cu(II)–morin complex. *J. Mol. Struct.* **967**, 47–53 (2010).
196. Santos, J. P., Zaniquelli, M. E. D., De Giovani, W. F. & Galembeck, S. E. Aluminum ion complex formation with 3-hydroxyflavone in Langmuir and Langmuir - Blodgett films. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **198–200**, 569–576 (2002).
197. Arandas, A. M. Investigação das propriedades fotofísicas do morin complexado com cátions de magnésio bivalente e cério trivalente. (Universidade de São Paulo, 2014).
198. Ferreira, J. V. N., Grecco, S. D. S., Lago, J. H. G. & Caseli, L. Ultrathin films of lipids to investigate the action of a flavonoid with cell membrane models. *Mater. Sci. Eng. C* **48**, 112–117 (2015).
199. Sanver, D., Murray, B. S., Sadeghpour, A., Rappolt, M. & Nelson, A. L. Experimental Modeling of Flavonoid-Biomembrane Interactions. *Langmuir* **32**, 13234–13243 (2016).
200. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem* **78**, 929–958 (2010).
201. SMITH, J. W. Packing Arrangement of Tropocollagen Molecules. *Nature* **205**, 356–358 (1965).
202. Giraud-Guille, M.-M. *et al.* Liquid crystalline properties of type I collagen: Perspectives in tissue morphogenesis. *Comptes Rendus Chim.* **11**, 245–252 (2008).
203. Giraud-Guille, M. M. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif. Tissue Int.* **42**, 167–180 (1988).
204. Giraud-Guille, M. M., Besseau, L. & Martin, R. Liquid crystalline assemblies of collagen

- in bone and in vitro systems. *J. Biomech.* **36**, 1571–1579 (2003).
205. Kirkwood, J. E. & Fuller, G. G. Liquid crystalline collagen: A self-assembled morphology for the orientation of mammalian cells. *Langmuir* **25**, 3200–3206 (2009).
 206. Besseau, L. & Giraud-Guille, M. M. Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gelled matrices. *J. Mol. Biol.* **251**, 197–202 (1995).
 207. De Sa Peixoto, P. *et al.* Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter* **9**, 11241 (2013).
 208. Martin, R. *et al.* Liquid crystalline ordering of procollagen as a determinant of three-dimensional extracellular matrix architecture. *J. Mol. Biol.* **301**, 11–17 (2000).
 209. Besseau, L., Coulomb, B., Lebreton-Decoster, C. & Giraud-Guille, M.-M. Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture. *Biomaterials* **23**, 27–36 (2002).
 210. Mosser, G., Anglo, A., Helary, C., Bouligand, Y. & Giraud-Guille, M. M. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biol.* **25**, 3–13 (2006).
 211. Bouligand, Y., Deneffe, J. P., Lechaire, J. P. & Maillard, M. Twisted architectures in cell-free assembled collagen gels: study of collagen substrates used for cultures. *Biol. Cell* **54**, 143–162 (1985).
 212. Price, J. C., Roach, P. & El Haj, A. J. Liquid Crystalline Ordered Collagen Substrates for Applications in Tissue Engineering. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2**, 625–633 (2016).
 213. Tang, M. *et al.* Collagen films with stabilized liquid crystalline phases and concerns on osteoblast behaviors. *Mater. Sci. Eng. C* **58**, 977–985 (2016).
 214. Chung, W.-J. *et al.* Biomimetic self-templating supramolecular structures. *Nature* **478**, 364–368 (2011).
 215. Jin, H. E. *et al.* Biomimetic Self-Templated Hierarchical Structures of Collagen-Like Peptide Amphiphiles. *Nano Lett.* **15**, 7138–7145 (2015).
 216. Williams, B. R., Gelman, R. A., Poppke, D. C. & Piez, K. A. Collagen fibril formation. *J. Biol. Chem.* **253**, 6578–6585 (1978).
 217. Li, Y., Asadi, A., Monroe, M. R. & Douglas, E. P. pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding. *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 1643–1649 (2009).
 218. Cisneros, D. A., Friedrichs, J., Taubenberger, A., Franz, C. M. & Muller, D. J. Creating ultrathin nanoscopic collagen matrices for biological and biotechnological applications. *Small* **3**, 956–963 (2007).
 219. Wang, J., Petefish, J. W., Hillier, A. C. & Schneider, I. C. Epitaxially grown collagen fibrils reveal diversity in contact guidance behavior among cancer cells. *Langmuir* **31**, 307–314 (2015).
 220. Lee, C. H., Singla, A. & Lee, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* **221**, 1–22 (2001).
 221. Sinani, V. A. *et al.* Collagen Coating Promotes Biocompatibility of Semiconductor Nanoparticles in Stratified LBL Films. *Nano Lett.* **3**, 1177–1182 (2003).
 222. Monroe, M. R., Li, Y., Ajinkya, S. B., Gower, L. B. & Douglas, E. P. Directed collagen patterning on gold-coated silicon substrates via micro-contact printing. *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 2365–2369 (2009).
 223. Salhi, B. *et al.* The collagen assisted self-assembly of silicon nanowires. *Nanotechnology* **20**, 235601 (2009).
 224. Kadler, K. E., Hojima, Y. & Prockop, D. J. Assembly of Collagen Fibrils de Novo by Cleavage of the Type I pC- Collagen with Procollagen C-Proteinase. *J. Biol. Chem.* **260**, 15696–15701 (1987).
 225. Usha, R. & Ramasami, T. Influence of hydrogen bond, hydrophobic and electrovalent salt linkages on the transition temperature, enthalpy and activation energy in rat tail tendon (RTT) collagen fibre. *Thermochim. Acta* **338**, 17–25 (1999).
 226. Zhang, Y., Herling, M. & Chenoweth, D. M. General Solution for Stabilizing Triple Helical Collagen. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 9751–9754 (2016).
 227. Gale, M., Pollanen, M. S., Markiewicz, P. & Goh, M. C. Sequential assembly of collagen

- revealed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **68**, 2124–8 (1995).
228. Fang, M., Goldstein, E. L., Matich, E. K., Orr, B. G. & Banaszak Holl, M. M. Type I Collagen Self-Assembly: The Roles of Substrate and Concentration. *Langmuir* **29**, 2330–2338 (2013).
 229. Jiang, F., Hörber, H., Howard, J. & Müller, D. J. Assembly of collagen into microribbons: effects of pH and electrolytes. *J. Struct. Biol.* **148**, 268–78 (2004).
 230. KADLER, K. E., HOLMES, D. F., TROTTER, J. A. & CHAPMAN, J. A. Collagen fibril formation. *Biochem. J.* **316**, 1–11 (1996).
 231. Cisneros, D. A., Hung, C., Franz, C. M. & Muller, D. J. Observing growth steps of collagen self-assembly by time-lapse high-resolution atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **154**, 232–245 (2006).
 232. Loo, R. W. & Goh, M. C. Potassium ion mediated collagen microfibril assembly on mica. *Langmuir* **24**, 13276–13278 (2008).
 233. Williams, R., Gelman, A., Poppke, C. & Piez, K. Collagen fibril formation: optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results. *J. Biol. Chem.* **253**, 6578–6585 (1978).
 234. Sun, M., Stetco, A. & Merschrod S., E. F. Surface-templated formation of protein microfibril arrays. *Langmuir* **24**, 5418–5421 (2008).
 235. Leow, W. W. & Hwang, W. Epitaxially guided assembly of collagen layers on mica surfaces. *Langmuir* **27**, 10907–10913 (2011).
 236. Wang, L., Guo, Y., Li, P. & Song, Y. Anion-specific effects on the assembly of collagen layers mediated by magnesium ion on mica surface. *J. Phys. Chem. B* **118**, 511–518 (2014).
 237. Chung, W.-J. *et al.* Biomimetic self-templating supramolecular structures. *Nature* **478**, 364–368 (2011).
 238. Oh, J.-W. *et al.* Biomimetic virus-based colourimetric sensors. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
 239. Lee, B. Y. *et al.* Virus-based piezoelectric energy generation. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 351–356 (2012).
 240. Tom, S., Jin, H.-E., Heo, K. & Lee, S.-W. Engineered phage films as scaffolds for CaCO₃ biomineralization. *Nanoscale* **8**, 15696–15701 (2016).
 241. Ayres, C. E. *et al.* Measuring fiber alignment in electrospun scaffolds: a user's guide to the 2D fast Fourier transform approach. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **19**, 603–621 (2008).
 242. Maeda, H. Observation of spatially rhythmic patterns from evaporating collagen solution droplets. *Langmuir* **16**, 9977–9982 (2000).
 243. Deegan, R. D. *et al.* Contact line deposits in an evaporating drop. *Phys. Rev. E* **62**, 756–765 (2000).
 244. Mino, Y., Watanabe, S. & Miyahara, M. T. In Situ Observation of Meniscus Shape Deformation with Colloidal Stripe Pattern Formation in Convective Self-Assembly. *Langmuir* **31**, 4121–4128 (2015).
 245. Deegan, R. D. *et al.* Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* **389**, 827–829 (1997).