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

**“Formação biomimética de fosfatos de cálcio sobre superfície de titânio
utilizando-se filmes Langmuir-Blodgett: influência da incorporação de
colágeno nas matrizes”**

Gilia Cristine Marques Ruiz

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

2015

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

**“Formação biomimética de fosfatos de cálcio sobre superfícies de
titânio utilizando-se filmes Langmuir-Blodgett: influência da
incorporação de colágeno nas matrizes”**

Gilia Cristine Marques Ruiz

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

2015

VERSÃO CORRIGIDA

FICHA CATALOGRÁFICA

Ruiz, Gília Cristine Marques

Formação biomimética de fosfatos de cálcio sobre superfícies de titânio utilizando-se filmes Langmuir-Blodgett: influência da incorporação de colágeno nas matrizes. Ribeirão Preto, 2015.

97 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.Filmes Langmuir-Blodgett. 2.Hidroxiapatita. 3.Colágeno.

*“O temor do SENHOR é o principio da sabedoria; revelam prudência todos os
que praticam. O seu louvor permanece para sempre”*

(Salmos 111:10)

Dedicatória

Dedico esse trabalho a meu pai Lindolfo, minha mãe Dineusa e meu esposo Bruno. Certamente sem o apoio incondicional de vocês eu não conseguiria.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por estar comigo todos os dias da minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Ramos, exemplo de pessoa e profissional, por ter me dado a oportunidade de iniciar minha vida acadêmica, por sua amizade e incentivo e pelo muito que me ensinou, tanto na ciência como na vida; fatos sem os quais não seria possível a realização deste curso de mestrado. Levarei essa experiência por onde passar.

Aos meus amigos do Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides: Anna Popi, Camila, Lucas, Maike, Marco e Rafael que foram e são muito importante para mim. Em especial ao meu amigo Marcos, pelo apoio, parceria e amizade tão valiosas.

Ao prof. Dr. Pietro Ciancaglini e ao Laboratório de Sistemas Biomiméticos de Membrana (USP-RP) pela valiosa colaboração tanto nos experimentos como na discussão de artigos e trabalhos.

A todos os professores e funcionários do departamento de química da FFCLRP que contribuíram para minha formação acadêmica e para a realização desse trabalho. Em especial aos técnicos Rodrigo, Ivana e Lourivaldo pela importante colaboração.

Aos meus pais e toda minha família, pelas orações, por todo carinho e amor e por serem meus primeiros exemplos de vida, sempre.

Ao Bruno, pelo amor, amizade, compreensão e paciência. Obrigada pela força e por todos os bons momentos que se tornaram melhores por estar ao seu lado.

As minhas mais que amigas Tutti, Larissa e Mariana por fazerem parte da história da minha vida.

A todos os amigos que fiz na faculdade. Obrigada por todos os bons e inesquecíveis momentos que vivemos nesses quase 8 anos de USP Ribeirão.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito...

Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser.

Mas graças a Deus, não somos o que éramos”.

(Martin Luther King)

Resumo

RUIZ, Gilia C. M. Formação biomimética de fosfatos de cálcio sobre superfícies de titânio utilizando-se filmes Langmuir-Blodgett: influência da incorporação de colágeno nas matrizes. 2015. 94 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Filosofia de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O intuito do desenvolvimento de biomateriais potencialmente aplicáveis como implantes de substituição óssea é sintetizar superfícies que induzam respostas biológicas positivas quando em contato com o tecido hospedeiro. Para isso, faz-se necessário não somente estudos de composição química, mas também é importante buscar compreender propriedades físicas e estruturais dos sistemas que estes materiais irão substituir. O osso natural é constituído por compostos orgânicos, especialmente proteínas como o colágeno, reforçado com minerais, tais como hidroxiapatita. O processo pelo qual ocorre a formação do componente inorgânico é chamado biomineralização. Uma maneira de introduzir macromoléculas em sistemas modelo para estudos de biomineralização é a formação de monocamadas Langmuir, que são camadas monomoleculares altamente organizadas de moléculas anfifílicas na interface líquido-ar. Essas monocamadas podem ser transferidas para suportes sólidos formando filmes de Langmuir-Blodgett. Neste estudo, foi investigado a incorporação de colágeno tipo-I em monocamadas insolúveis contendo os fosfolípidos 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) ou ácido octadecilfosfônico (OPA), bem como a transferência dessas monocamadas para suportes de titânio por meio da técnica de Langmuir-Blodgett. Estes filmes foram utilizados como matrizes para o crescimento de hidroxiapatita biomimética após a exposição dos discos de titânio modificados a uma solução que simula a concentração de íons e pH do plasma sanguíneo humano. As amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) e difração de raios-X (DRX). A razão molar Ca/P foi determinada por espectroscopia de dispersão de energia de raios-X (EDX). Propriedades dos biomateriais como molhabilidade, rugosidade e energia livre de superfície também foram estudadas. A biocompatibilidade das amostras foi investigada *in vitro* utilizando-se ensaios de viabilidade de osteoblastos. O colágeno interage com os fosfolípidos na interface água/ar, como evidenciado pelas isotermas de pressão de superfície, obtidas na presença da proteína. Além disso, a estabilidade das monocamadas de Langmuir foi aumentada devido à presença de colágeno na subfase. A incorporação de colágeno e fosfolípidos em filmes Langmuir-Blodgett sobre as superfícies de titânio são fatores determinantes para a formação de filmes inorgânicos altamente organizado, contínuos e uniformes, compostos por nanopartículas de hidroxiapatita biomimética, semelhante à encontrada no osso natural. As modificações nas superfícies aumentaram a proliferação de osteoblasto no titânio indicando que este material não é tóxico a este tipo de célula.

Palavras chaves: 1.Filmes Langmuir-Blodgett, 2.Hidroxiapatita, 3.Colágeno

Abstract

RUIZ, Gilia C. M. Biomimetic formation of calcium phosphate on titanium surface using Langmuir-Blodgett films: influence of collagen incorporation into the matrices. 2015. 94 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Filosofia de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The development potential of biomaterials for bone replacement is guided by the necessity to provide a surface that induces positive biological responses when the material is in contact with the host tissue. For this, it is necessary the study of the chemistry and surface composition and also to understand the physical properties and the structural organization of the natural system which is in contact with the biomaterial. Natural bone is composed by organic compounds, especially protein like collagen, reinforced with minerals, such as hydroxyapatite. The process by which the formation of the inorganic component takes place is named biomineralization. One way to introduce macromolecules in model systems for biomineralization studies is the formation of Langmuir monolayers, which are highly organized monomolecular layers of amphiphilic molecules adsorbed at the liquid-air interface. These monolayers can be transferred to solid substrate to form the Langmuir-Blodgett films. In this study, it was investigated the incorporation of type-I collagen in insoluble Langmuir monolayers containing either 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) or octadecylphosphonic acid (OPA) and their transference to titanium supports using the Langmuir-Blodgett technique. These films were used as matrices to the growth of biomimetic hydroxyapatite by the exposure of the modified titanium discs to a solution that mimics the ions concentration and pH of the human blood plasma. The samples were characterized by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), vibrational spectroscopy in the infrared region (FTIR), and X-ray diffraction (XRD). The Ca/P molar ratio was determined by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The properties of the biomaterials as wettability, roughness, and surface free energy were also studied. The biocompatibility of the samples was studied *in vitro* using osteoblasts viability assays. The collagen interacts with the phospholipids at air/water interface as evidenced by the pressure surface-surface area isotherms obtained in the presence of the protein. Moreover, the stability of the Langmuir monolayers was increased when collagen is present at the subphase. The incorporation of collagen and phospholipids on the titanium surfaces is important to the formation of organized, continuous and uniform inorganic films composed by biomimetic hydroxyapatite nanoparticles, similar to that found in the natural bone. These films are not toxic to osteoblasts as evidenced by the stimulation of their proliferation on the titanium-modified samples.

Keywords: 1.Langmuir-Blodgett films, 2.Hydroxyapatite, 3.Collagen

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura hierárquica do osso em macro e nanoescala.....	24
Figura 2: Esquema da organização fibrilar do colágeno tipo-I nos tecidos quando este é liberado para o meio extra celular.	28
Figura 3: Esquema de uma cuba de Langmuir.	31
Figura 4: Ilustração da placa do sensor de Wilhelmy bem como as forças que atuam sobre a mesma.	32
Figura 5: Isoterma $\pi \times A$ evidenciando a compressão da monocamada em diferentes estágios de compactação.....	34
Figura 6: Filmes do tipo Y, X e Z formados pela técnica LB.	34
Figura 7: Ilustração e equação para a determinação da rugosidade aritmética	42
Figura 8: a) ângulo de contato (θ_c) entre uma gota e a superfície sólida e as tensões interfaciais envolvidas e b) Equação de Young.....	43
Figura 9: Estruturas químicas dos fosfolipídeos a) OPA e b) DPPC	46
Figura 10: a) Esquema de formação de filmes tipo Y e (b) procedimento para o crescimento de fosfato de cálcio e testes de bioatividade sobre os filmes LB.	49
Figura 11: Espectro de Dicroísmo Circular de colágeno tipo-I em n-propanol/ácido acético (1:9), pH = 4,3 a 20°C.	54
Figura 12: Isotermas de pressão de superfície vs área por molécula para a) OPA e b) DPPC em subfase contendo água pura ($\bullet$), água+ colágeno ($\circ$), CaCl_2 1 mmolL^{-1} ($\blacksquare$) e CaCl_2 1 mmolL^{-1} + colágeno($\circ$). O encarte mostra a isoterma de pressão de superfície da solução de colágeno injetado na subfase contendo água pura na ausência das monocamadas.	56
Figura 13: Representação esquemática da interação lipídeo-proteína na interface líquido-ar.	58
Figura 14: Estabilidade das monocamadas de a) OPA e b) DPPC quando o colágeno é injetado em água pura, ou na subfase CaCl_2 1 mmol.L^{-1}	59

Figura 15: Imagem de AFM do a) filme de colágeno transferido para o suporte de mica por meio da técnica LB e b) colágeno gotejado na mica.	61
Figura 16: Micrografias de força atômica em mica de filmes de OPA (a,b) e DPPC (c,d) na ausência (a,c) e na presença (b,d) de colágeno na matriz lipídica.	62
Figura 17: Ponto isoelétrico do colágeno obtido por medidas de potencial zeta.	63
Figura 18: Imagens de Microscopia de Força Atômica das superfícies de Ti modificadas com os filmes de OPA (a e b) e DPPC (c e d) após a formação da fase mineral e exposição a SBF(37°C) por 12h, na ausência (a e c) e na presença (b e d) de colágeno na subfase de formação dos filmes LB.	66
Figura 19: Espectro de absorção no infravermelho da amostra de osso humano utilizada nesse trabalho.	67
Figura 20: Espectros de ATR-FTIR de discos de Ti modificados com a) OPA e b) DPPC, na presença (linha vermelha) e na ausência de colágeno (linha preta) após a exposição a CaCl_2 /tampão fosfato e por 12 horas em SBF. A linha verde mostra o espectro obtido para uma amostra de osso humano, para fins de comparação. Os encartes representam regiões ampliadas no espectro.	69
Figura 21: Espectro de EDS da amostra de DPPC contendo colágeno.	72
Figura 22: Padrões de difração das superfícies de titânio modificadas com 2 camadas de filme LB-OPA(a) ou LB-DPPC(b) após exposição a solução de SBF(37°C) por 12 h na presença (linha vermelha) e na ausência (linha preta) de colágeno, comparadas com do padrão de difração do osso humano (linha verde). Os picos marcados com * correspondem ao suporte de Ti.	74
Figura 23: Imagens de MEV das superfícies de Ti modificadas com o filme LB de OPA (a e b) e DPPC (c e d) expostos a ciclos Ca^{2+} /tampão fosfato antes (a e c) e após (b e d) a exposição à solução SBF(37°C) por 12h.	76
Figura 24: Imagens de MEV das superfícies de Ti modificadas com o filme LB de OPA (a, b e c) e DPPC(d, e e f) contendo colágeno após exposição a ciclos Ca^{2+} /tampão fosfato e à solução SBF (37°C) por 12h.	78
Figura 25: Teste de viabilidade celular com crescimento de osteoblastos por 7 e 14 dias das amostras de titânio não modificados, dos discos modificados com os filmes LB-OPA e LB-DPPC, exposto a 4 ciclos de solução aquosa CaCl_2 /tampão fosfato e 24 horas em SBF e dos discos modificados com os filmes LB-OPA e LB-DPPC + Colágeno, exposto a 4 ciclos de solução aquosa CaCl_2 /tampão fosfato e SBF por 24 horas.	84

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais tipos de biomateriais e aplicações	18
Tabela 2: Principais fases fosfatos de cálcio encontrados no meio biológico.....	25
Tabela 3: Ordem de adição dos reagentes para o preparo de 500 ml da solução SBF ...	50
Tabela 4: Valores de razão molar Ca/P obtidos por EDX.....	71
Tabela 5: Parâmetros de Rugosidade (R_a), Área Superficial (AS), Energia Livre de Superfície (SFE) e suas componentes dispersiva (γ^d) e polar (γ^p) e ângulo de contato com a água (θ) do titânio puro e das superfícies de titânio modificadas.....	81

Abreviaturas

Ti	Titânio
SBF	Simulated Body Fluid
HAp	Hidroxiapatita
LB	Langmuir-Blodgett
OPA	Ácido Octadecilfosfônico
DPPC	L- α -1,2-Dipalmitoil-sn-3-Glicero-Fosfatidilcolina
LC	Líquido Condensado
LE	Líquido Expandido
AFM	Microscopia de Força Atômica
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
ATR	Reflexão Total Atenuada
DRX	Difração de Raios-X
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Ra	Rugosidade Aritmética
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X
SFE	Energia Livre de Superfície

Índice

1. Introdução.....	16
1.1 Biomateriais.....	18
1.1.1 Biomateriais utilizados como implantes ósseos	18
1.1.2 Titânio.....	22
1.1.3 Osso humano: estrutura e composição	23
1.1.3.1 Hidroxiapatita.....	25
1.1.3.2 Colágeno	26
1.2 Sistemas biomiméticos	28
1.3 Monocamadas de Langmuir e Filmes Langmuir-Blodgett.....	30
1.4 Principais técnicas de caracterização de Filmes de Langmuir-Blodgett	36
1.4.1 Microscopia de Força Atômica.....	37
1.4.2 Espectroscopia de Infravermelho	38
1.4.3 Difração de Raios-X	39
1.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	41
1.4.5 Propriedades Superficiais: Rugosidade, ângulo de contato e Energia Superficial	41
2. Parte Experimental	45
2.1 Materiais	45
2.2 Preparo da solução de colágeno	47
2.3 Isotermas de Pressão de Superfície	47
2.4 Pré-tratamento dos Suportes metálicos.....	48

2.5	Formação das matrizes orgânicas	48
2.6	Preparo do SBF	49
2.7	Caracterização das superfícies	50
2.7.1	Caracterização Morfológica	50
2.7.2	Análise Química.....	51
2.7.3	Caracterização da fase mineral.....	51
2.7.4	Molhabilidade e Energia Livre de Superfície dos Filmes LB	52
2.8	Viabilidade de osteoblastos	52
3.	Resultados e Discussão	54
3.1	Análise conformacional do colágeno tipo-I.....	54
3.2	Monocamadas de Langmuir de OPA e DPPC.....	55
3.3	Estudo da incorporação de colágeno nos filmes LB.....	60
3.4	Análise Estrutural e Composicional dos filmes LB	67
3.4.1	ATR-FTIR	67
3.4.2	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X.....	71
3.4.3	Difração de Raios-X	72
3.5	Análise morfológica	74
3.6	Avaliação da textura e propriedades superficiais do Ti modificado	78
3.7	Viabilidade Celular.....	82
4	Conclusões e Perspectivas.....	85
	Referências	87

1. Introdução

O tema central deste trabalho abrange o estudo e modificações de superfícies metálicas para fins biomédicos. A modificação de superfícies de titânio (Ti), um dos biomateriais mais utilizados em processos de reparo e substituição óssea, é empregada visando aumentar a biocompatibilidade e a osteointegração entre o material implantado e o tecido ósseo.

Os biomateriais utilizados pra implantes de substituição óssea almejam reproduzir ou mimetizar a estrutura e propriedades do tecido ósseo, com a finalidade de se integrarem efetivamente no organismo hospedeiro. Sendo o tecido ósseo constituído a partir da interação entre componentes orgânicos e inorgânicos, surge a possibilidade de formação de materiais híbridos nanometricamente organizados, para tal fim.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é estudar a influência da incorporação de colágeno, proteína majoritariamente presente no tecido ósseo, na formação de matrizes orgânicas biomiméticas depositadas sobre suportes de Ti . Além disso, estudou-se os efeitos da composição e propriedades físico-químicas das matrizes no crescimento de biominerais.

De modo específico foram detalhados:

- Estudo das propriedades interfaciais de monocamadas de Langmuir constituídas por DPPC ou OPA na presença e ausência de colágeno na subfase.
- Transferência das monocamadas para discos de Ti utilizando-se a técnica Langmuir-Blodgett (LB).

-
- Caracterização dos filmes obtidos na presença e na ausência de colágeno por técnicas de microscopia, espectroscopia e difração de raios-X.
 - Avaliação da capacidade das matrizes orgânicas de promover o crescimento de fosfatos de cálcio dependente de sua composição e propriedades físico-químicas.
 - Testes de bioatividade das superfícies por meio da exposição das amostras de Ti à solução que simula a concentração de íons e pH do fluido corpóreo humano (SBF-do inglês *simulated body fluid*).
 - Estudo da toxicidade das superfícies por meio de ensaios de viabilidade celular e proliferação de células osteoblásticas cultivadas sobre estas matrizes.

1.1 Biomateriais

1.1.1 Biomateriais utilizados como implantes ósseos

O termo biomaterial foi definido em 1982 na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde, como: “Toda substância (exceto droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo¹”.

Em virtude do avanço biotecnológico e do desenvolvimento dos biomateriais, novos conceitos surgiram de modo a compreender o cenário atual. Como resultado, os critérios que um material precisa atender sugere a interação com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função no corpo humano, produzido ou modificado artificialmente².

Em relação à composição, os biomateriais podem ser polímeros sintéticos, metais, cerâmicas, macromoléculas naturais ou biopolímeros que são planejados para se adequarem ao uso como dispositivos médicos de forma a entrarem em contato íntimo com proteínas, células, tecidos e órgãos.

Com o intuito evidenciar alguns fatores que definem o sucesso da aplicação biomédica dos biomateriais, a Tabela 1 organizada por Kawachi et al.³ mostra a diversidade dessas aplicações, bem como as vantagens e desvantagens do uso desses biomateriais.

Tabela 1: Principais tipos de biomateriais e aplicações

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros Polietileno PTFE Poliéster Poliuretano PMMA Silicona	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Suturas, artérias, veias; maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); cimento, tendão artificial; oftalmologia.
Metais e ligas Aço inoxidável Liga de titânio Liga de cobalto-cromo	Alta força de tensão, alta resistência a desgaste, energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); implantes dentários
Cerâmicas e vidros Alumina Zircônia Carbono Fosfatos de cálcio Porcelanas Vidros bioativos	Boa compatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta resistência a compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traquéias artificiais
Compósitos Fibra de carbono-resina termofixa Fibra de carbono termoplástico Carbono-Carbono Fosfato de Cálcio-Colágeno	Boa biocompatibilidade, inércia, resistência a corrosão, alta força de tensão.	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelho (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade)

Os biomateriais com finalidade de serem utilizados em implantes de substituição óssea devem apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas compatíveis e não danosas ao sistema biológico hospedeiro. No passado, os materiais mais utilizados como implantes ósseos eram os metais nobres, como as ligas de ouro platina, que não são mais usados atualmente, pois além de possuírem preços elevados, apresentavam respostas biológicas adversas ao organismo hospedeiro.

Com o progresso da bioengenharia tecidual, passou-se a considerar uma nova classe de biomateriais metálicos como aço inoxidável, ligas a base de cobalto, titânio puro e ligas de titânio, classificados como matérias bioinertes e bioativos⁴; materiais de baixa densidade que são capazes de interagir com o meio biológico por meio de suas superfícies, de modo que a composição química e organização em níveis macro e microscópicos favoreça o crescimento ósseo.

Porém, a rejeição desses materiais, atribuídas à baixa interação superficial com o tecido ósseo que leva à formação de uma camada fibrosa na interface metal-tecido, resultando em processos inflamatórios, tem sido relatada⁵. Assim, com o intuito de promover a melhora da resposta biológica, inúmeras alterações das superfícies dos materiais tem sido propostas^{6,7}. Tais propostas visam aprimorar suas propriedades físico-químicas, e, na sua maioria, são baseadas no princípio de que uma melhor e mais rápida osteointegração pode ser alcançada mediante alteração da topografia, rugosidade, ou composição química da superfície do implante⁸.

Para o entendimento do mecanismo de osteointegração, que compreende desde fenômenos na matriz extracelular até a neofomação óssea, faz-se necessário explorar algumas definições das propriedades biológicas que os biomateriais candidados a implantes devem possuir. Dentre as mais importantes destaca-se:

- Bioatividade: Característica apresentada por um biomaterial quando este induz uma interação biológica na interface entre o material e o tecido ósseo^{9,10}.
- Biocompatibilidade: Habilidade de um implante de não produzir reações adversas quando integrados ao organismo². Uma material biocompatível tem como fatores determinantes sua composição química e propriedades físicas superficiais e, de um modo geral deve ser não-tóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico.
- Osteogênese: Processo de produção de um novo tecido ósseo por meio da diferenciação de células osteoprogenitoras presentes no osso ou no biomaterial¹¹.
- Osteoindução: Capacidade de um material induzir a formação de células formadoras de osso^{11,12}.
- Osteocondução: Um biomaterial osteocondutor serve como um arcabouço temporário, onde as células mesenquimais diferenciadas interagem com o implantes promovendo a formação de cartilagem e em seguida a ossificação^{11,12}.
- Osteointegração: Capacidade do material se ligar ao osso, permitindo, por meio desse contato direto, a incorporação do implante no organismo hospedeiro⁹.

1.1.2 Titânio

Atualmente o Ti é um dos principais biomateriais utilizados como implantes¹³. Os materiais compostos por esse elemento possuem características como baixa densidade, alta resistência mecânica, preço relativamente baixo e elevada estabilidade química, devido à formação espontânea de uma camada de óxido de titânio em sua superfície¹⁴.

O Ti é vendido comercialmente puro ou em ligas, como por exemplo Ti-6Al-4V (contendo pequenas porcentagens de alumínio e vanádio), e, apesar de ser utilizados em muitos estudos¹⁵⁻¹⁷, Eisenbarth et al.¹⁸, utilizando cultura de fibroblastos, mostraram que a liberação de íons de vanádio, a partir de superfícies formadas por essa ligas, causaria efeito negativo na adesão celular.

Já o Ti puro, como consequência de sua alta estabilidade química, tem a característica de ser superficialmente pouco reativo, tendo seu uso como implante restrito por dificultar as reações bioquímicas que irá induzir a osteointegração¹⁹.

A superfície de Ti pode ser física ou quimicamente modificada a fim de melhorar a integração biomaterial-tecido. Desta forma, diversos estudos são desenvolvidos com o intuito de alterar a sua morfologia e/ou sua composição. Os métodos mais utilizados envolvem tratamentos físicos, químicos ou recobrimentos com fosfatos de cálcio²⁰, principalmente hidroxiapatita (HAp), que será explorada na próxima seção.

Grande parte dos estudos relacionados às modificações de superfícies metálicas estão direcionados principalmente para oxidação térmica, sínteses hidrotermais, plasma spray, implantação de íons e processos coloidais^{21,22}. Contudo, materiais formados por

esses métodos de tratamento térmico podem, segundo a literatura²², variar a composição química da hidroxiapatita depositada, além de se degradarem após determinado período de implantação, o que desfavorece a bioatividade desses materiais modificados quando em contato com o organismo hospedeiro. Além disso, são técnicas que apresentam desvantagens quanto ao gasto energético do processo, dificuldade na obtenção de recobrimento uniformes e baixa adesão.

O uso mais recente de sínteses biomiméticas para a deposição de HAp sobre Ti oferece vantagens pois são capazes de mimetizar, além da composição química, a estrutura nanométricamente organizada o tecido ósseo, oferecendo às primeiras células contato com material semelhante ao seu tecido de origem²³.

1.1.3 Osso humano: estrutura e composição

O osso humano trata-se de uma estrutura altamente hierárquica, sendo necessário um estudo dos seus vários níveis de organização a fim de obter uma compreensão completa da influência da estrutura e composição nas suas propriedades²⁴.

A função do osso é basicamente de sustentação e proteção dos órgãos do corpo. Trata-se de um tecido conjuntivo que possui quatro tipos de células. As células *osteoprogenitoras* são derivadas da diferenciação de células-tronco mesenquimais com o potencial de se diferenciarem em *osteoblastos*¹¹, que por sua vez, são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea e produzem a enzima fosfatase alcalina, importante no processo de mineralização²⁵. As células derivadas dos osteoblastos são os *osteócitos* que ocupam lacunas ou cavidades dentro da matriz óssea

calcificada²⁶. Os *osteoclastos*, são células gigantes responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo²⁷.

O osso é composto por uma matriz orgânica e uma fase mineral. A primeira é formada em sua maioria por colágeno tipo I, além de proteínas não-colagenosas. A parte inorgânica é constituída por fosfatos de cálcio (apatitas biológicas), principalmente a HAp. A compreensão das interações entre as moléculas de colágeno e a HAp possuem um papel significativo no desenvolvimento de biomateriais²⁸ e na criação de superfícies bioativas²⁹ que promovam a adsorção de proteínas e a proliferação de osteoblastos.

Em uma visão micro e nanoscópica, o osso pode ser observado com uma estrutura onde as fibras de colágeno estão circundadas e infiltradas por minerais³⁰. A Figura 1 proposta por Nair et al³¹ mostra um esquema da organização hierárquica do osso ao longo de diferentes escalas de comprimento, que revela uma camada exterior calcificada, a qual compreende sistemas cilíndricos. Esses sistemas, formados por células denominadas ósteons, são revestidos por receptores de membrana celular que respondem a sítios de ligação específicos³². Uma das hipóteses mais aceitas sugere que durante a formação de osso, as moléculas de colágeno organizadas em fibrilas são mineralizadas por meio da formação de cristais de HAp provenientes de microvesículas sintetizadas por osteoblastos³¹.

Figura 1: Estrutura hierárquica do osso em macro e nanoescala.

1.1.3.1 Hidroxiapatita

Diferentes formas de apatitas podem ser encontradas na natureza e estudadas para serem empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo (Tabela 2)³³. A aplicação desses compósitos sobre dispositivos metálicos oferece a possibilidade de combinar a resistência dos metais com a bioatividade de compostos inorgânicos.

Tabela 2: Principais fases fosfatos de cálcio encontrados no meio biológico

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Razão molar Ca/P	Ocorrência
Hidroxiapatita (HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário e urinário.
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5	Cálculo dentário e urinário.
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	Cálculo dentário e urinário.
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	Cálculo dentário, ossos decompostos.
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias.
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	Calcificação de tecido mole. Depósitos de pseudo-gotas em fluidos.

O grande interesse pela HAp - fosfato de cálcio que possui fórmula estrutural $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - como constituinte de um biomaterial, está relacionado com o fato desta ser a principal fase mineral encontrada no tecido ósseo^{34,35} e ter alta biocompatibilidade³⁶, apresentando ausência de toxicidade e de respostas inflamatórias e habilidades em se ligar ao tecido hospedeiro³.

Sabe-se contudo também que HAp possui baixa resistência mecânica, que por sua vez é aumentada pela presença de proteínas osteointegradoras, como o colágeno. Este biomineral permite interação do tipo van der Waals e ligações de hidrogênio^{37,38}, facilitando a adsorção das moléculas de água e também proteínas na sua superfície, um importante mecanismo da regeneração tecidual.

Nessa perspectiva existe a tendência da criação de biomateriais que contenham matrizes ou compósitos de Hap e colágeno nanoestruturados e que possuem propriedades otimizadas para funções específicas de reparação óssea³⁹.

1.1.3.2 Colágeno

O colágeno é um dos principais constituintes dos seres vivos. Esta presente na pele, osso, tendão, vasos sanguíneos e interstícios de tecidos e órgãos⁴⁰. É uma proteína fibrosa e o componente principal do tecido conjuntivo de mamíferos, além de estar envolvida em muitas funções biológicas importantes, tais como a regeneração do tecido e a adesão celular⁴¹.

Sua produção se dá pelos fibroblastos e osteoblastos na forma de pró-colágeno. São reportados atualmente 28 tipos de colágeno. Os colágenos do tipo I, II, III, V são os principais e constituem a parte essencial da proteínas encontradas no osso, cartilagem,

tendão. Em especial, no tecido ósseo o colágeno do tipo I é o maior componente das fibrilas que constituem o tecido ósseo^{28,42,43}, com função estrutural de ancoragem dos cristais nanométricos de hidroxiapatita⁴⁰. O que difere os tipos de colágeno são as cadeias α polipeptídicas que forma a tripla hélice, que, associadas 3 a 3, dão origem aos diferentes tipos de colágeno conhecidos.

O colágeno tipo I é formado por 3 cadeias polipeptídicas organizadas na forma de hélices e caracterizadas, geralmente, pela repetição de um triplete Glicina-Prolina-Hidroxiprolina⁴⁴ (Figura 2).

Essa estrutura corresponde a sua estrutura monomérica (tropocolágeno), que se organiza formando as microfibrilas que são liberadas para o meio extra-celular e se reorganizam, formando as fibras. Essa rede de fibrilas formada na matriz extra-celular é estabilizada pela formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares, formadas tanto enzimaticamente quanto por condensação de resíduos de aminoácidos. Essas ligações são responsáveis pela estabilização da molécula e das fibras de colágeno e também pela propriedade de resistência à tração conferida ao osso pelo colágeno, conferindo alta resistência mecânica ao tecido. As características peculiares da estrutura óssea norteiam a importância do design biomimético dos materiais.

Figura 2: Esquema da organização fibrilar do colágeno tipo-I nos tecidos quando este é liberado para o meio extra celular.

1.2 Sistemas biomiméticos

Sistemas auto-organizados são aqueles capazes de formar estruturas complexas ordenadas devido à orientação espontânea de seus constituintes em equilíbrio. Muitos sistemas encontrados na natureza são formados por estruturas que possuem a capacidade de se auto-organizar, formando aglomerados de moléculas em meio aquoso que, por meio de precipitação controlada, podem levar à formação de sólidos altamente ordenados. São exemplos desses sistemas⁴⁵: a membrana celular formada por bicamadas lipídicas-, as fibras da seda, a dupla-hélice do DNA, as fibras de colágeno, que constituem o maior componente da pele e tecido ósseo de muitos animais, as fibras de queratina, sistemas provenientes da biomineralização como conchas e dentes de mamíferos.

Nessa perspectiva, muitos trabalhos foram desenvolvidos nas últimas décadas com o intuito de compreender esse processo organizacional e também estudar formas de aplicação desses sistemas no desenvolvimento de novos materiais e dispositivos^{46,47}.

Dentre os mais conhecidos e mais usuais destaca-se o Velcro®, desenvolvido a partir da observação de espinhos e ganchos que se prendiam nos pelos de animais e tecidos e superfícies de baixo atrito baseado na maneira como a pele dos peixes reage em contato com a água⁴⁸. Superfícies superhidrofóbicas baseadas na flor-de-lotus e adesivos inspirados na patas de lagartixas também são exemplos de materiais desenvolvidos a partir da observação de fenômenos naturais. É nesse cenário que podemos introduzir o conceito de biomimética⁴⁹, que tem por base analisar sistemas naturais e reproduzir suas propriedades, buscando os subsídios primordiais para o processo de desenvolvimento do produto. Deste modo, esses mecanismos naturais pontos de partida de criações nas áreas de design, arte, ciências, engenharia e da arquitetura, proporcionado surpreendentes modelos copiados ou adaptados.

Muitos sistemas encontrados *in vivo*, como as membranas de células e organelas, são utilizados como modelo nos estudos relacionados às propriedades da membrana biológica⁵⁰. Contudo, devido às dificuldades em se isolar as membranas *in vivo* para investigações em nível molecular, modelos biomiméticos de membranas, como monocamadas de Langmuir e filmes LB são amplamente utilizados. Perturbações nestes sistemas modelo são bons indicadores do que ocorre em processos biológicos.

1.3 Monocamadas de Langmuir e Filmes Langmuir-Blodgett

Monocamadas de Langmuir são camadas altamente organizadas compostas por moléculas anfifílicas insolúveis na interface líquido/ar. No início do século 20, Irving Langmuir iniciou seus estudos dando início ao desenvolvimento de filmes de Langmuir⁵¹. Mais tarde, na década de 30, essa técnica foi aperfeiçoada com auxílio de sua aluna Katharine Blodgett⁵², o que permitiu a deposição sucessiva de monocamadas sobre um mesmo substrato sólido⁵³. Tais filmes passaram ser denominados filmes de Langmuir-Blodgett (LB).

As monocamadas de Langmuir e os de filmes LB possuem hoje diversas aplicações como modificação e proteção de superfícies metálicas, recobrimento de materiais ópticos e eletrônicos para obtenção de biosensores^{54,55}. Porém, desde o início, por possuírem grande similaridade com a membrana celular, tem sido amplamente utilizadas como modelos miméticos bidimensionais e simplificados desses sistemas^{56,57}. Utilizando-se a técnica de LB é possível representar modelos mais fiéis se comparados à membrana celular, devido à possibilidade de formação de bicamadas lipídicas. Ainda, estes filmes são utilizados para a incorporação de macromoléculas e criação de superfícies bioativas⁵⁸, entender processos biológicos em nível molecular, estudar a incorporação aos filmes finos substâncias de interesse (tais como fármacos)⁵⁹ ou investigar fenômenos que ocorrem em membranas celulares, como por exemplo, mecanismos de funcionamento de proteínas⁶⁰.

As monocamadas de Langmuir e os filmes LB são obtidos em uma cuba de Langmuir⁶¹ (Figura 3: Esquema de uma cuba de Langmuir.Figura 3). Alguns microlitros de uma solução, geralmente clorofórmica, contendo a substância anfifílica a ser

estudada é espalhada na superfície da subfase, que pode ser água pura ou solução aquosa de interesse, e uma barreira móvel horizontal promove a diminuição da área na superfície.

Figura 3: Esquema de uma cuba de Langmuir.

O processo de compressão é acompanhado pela isoterma de Langmuir, que relaciona a pressão de superfície (π) *versus* a área ocupada por molécula (A) calculada pela diferença entre a tensão superficial da subfase pura (γ_0) e a tensão superficial da subfase + monocamada (γ), sendo $\pi = \gamma_0 - \gamma$. O valor da tensão superficial é obtido utilizando-se o método de Wilhelmy⁶². Para a medida de π , esse método calcula, utilizando-se um sensor constituído por um papel filtro conectado a uma eletrobalança, a variação de γ , de modo que a força resultante da imersão do papel de filtro na solução seja diretamente proporcional à tensão superficial.

Pela Figura 4, pode-se observar que as forças que agem sobre a placa são: de modo descendente a força peso (P), relacionado à gravidade, e, a tensão superficial (γ); e o empuxo (E), força ascendente, reativo ao volume de água deslocado pela placa.

Figura 4: Ilustração da placa do sensor de Wilhelmy bem como as forças que atuam sobre a mesma.

A figura também evidencia o ângulo θ entre a placa e a água e a largura (l) e a espessura (e) da placa. A força resultante medida pela balança é dada pela equação:

$$F_R = P + \gamma - E$$

Sabendo-se que a tensão superficial para esse caso é dada por:

$$\gamma = [2(l + e)\cos\theta]\gamma_{\text{água}},$$

e considerando uma placa estacionária, onde o peso e o empuxo são constantes podemos determinar a pressão de superfície como a variação da força medida pela eletrobalança, como mostrada na equação:

$$\pi = \frac{\Delta F}{\Delta\gamma[2(l + e)\cos\theta]}$$

Assumindo que medida da espessura da placa é desprezível que o papel filtro “molha-se” por inteiro tem-se:

$$\pi = \Delta\gamma = \frac{\Delta F}{2l},$$

evidenciando que a medida de π pelo método de Wilhelmy é descrito pela variação da forças do sistema devido à presença da monocamada e da largura da placa, fazendo necessário um rigor entre a medida do papel usado e aquela informada pelo software da cuba de Langmuir.

A compressão das monocamadas passam por 3 fases distintas (Figura 5): fase gasosa (G), na qual as moléculas do lipídeo praticamente não interagem entre si; fase líquido-expandido (LE), que surge quando a área disponível por molécula é diminuída e assim as interações intermoleculares entre as caudas hidrofóbicas dos tensoativos tornam-se significativas e a fase líquido-condensado (LC), caracterizada pelo maior empacotamento das moléculas que provoca limitação do seu movimento translacional na interface. Nessa fase π aumenta exponencialmente como resultado da queda brusca de γ . Em alguns casos de moléculas anfifílicas simples, como os ácidos carboxílicos de cadeia longa, um estado de maior ordenamento, denominado estado sólido, pode ser observado.

À medida que a monocamada é comprimida, as moléculas anfifílicas podem agrupar-se desordenadamente umas sobre as outras provocando o colapso do filme.

Figura 5: Isotherma $\pi \times A$ evidenciando a compressão da monocamada em diferentes estágios de compactação.

O processo de transferência da monocamada pode ser realizado por três diferentes maneiras dando origem a filme tipo Y, X ou Z (Figura 6), baseado na organização das moléculas sobre o suporte sólido. Filmes tipo Y são mais comuns por possuírem 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.

Figura 6: Filmes do tipo Y, X e Z formados pela técnica LB.

Monocamadas de Langmuir são muito exploradas para o crescimento ordenado de biominais na interface ar-água⁶³⁻⁶⁶. Porém, os primeiros estudos a utilizar filmes LB para o crescimento de biominais foi desenvolvido por Costa e Maquis⁶⁷, apenas em 1998 onde o filme LB produzido constituiu uma matriz orgânica que mostrou controlar a nucleação de cristais de fosfatos de cálcio. Recentemente, de Souza et al.⁶⁸ propuseram o crescimento de HAp biomimética sobre superfícies metálicas induzido pela exposição das matrizes a uma solução SBF^{69,70}.

Estes estudos mostram que a combinação entre a elevada resistência mecânica dos metais, propriedades biomiméticas das matrizes LB e as propriedades osteocondutoras de biominais fazem dos revestimentos biomiméticos depositados sobre superfícies metálicas potenciais biomateriais a serem aplicados em cirurgias de reparo ósseo.

No entanto, com o intuito desses implantes mimetizarem fielmente as propriedades osso humano faz-se necessário à adição de outro componente principal dos tecidos que formam a estrutura natural: as proteínas.

Nesse contexto estudos envolvendo os efeitos da adsorção de colágeno em filmes, as propriedades de substratos, preparo de soluções de colágeno, procedimento de preparação da amostra tem sido realizados⁷¹. Foi reportado também na literatura análises da adsorção de colágeno extraído do tendão de ratos a um pH baixo sobre a superfície de vidro, vidro siliconizado e Teflon⁷². Os trabalhos relacionados com adsorção desta proteína em filmes são geralmente realizados utilizando-se mica^{73,74} e outros filmes finos de polímeros^{75,76} como suportes. Somente em 2007 que Chen et al.⁷⁷ fizeram o uso de monocamadas de Langmuir e técnica de LB para investigar a adsorção de colágeno em suportes sólidos.

1.4 Principais técnicas de caracterização de Filmes de

Langmuir-Blodgett

Uma vez que filmes nanoestruturados tem sido largamente utilizados, principalmente pela possibilidade de controle de suas propriedades em nível molecular⁷⁸, faz-se também necessária uma compreensão do uso de determinadas técnicas de caracterização desses filmes.

A caracterização dos materiais é importante pois permite uma correlação entre sua microestrutura, composição e propriedades, sejam elas mecânicas, elétricas, de bioatividade, ópticas, químicas e muitas outras. A avaliação dessas propriedades visa, principalmente, fomentar o desempenho do material, bem como minimizar danos e falhas na fabricação e utilização do produto.

Na ciência dos biomateriais, a caracterização em nanoescala é fundamental para a entender o aumento de propriedades biológicas, como a osteoindução, nesses nanomateriais⁷⁹. As técnicas mencionadas e discutidas nessa dissertação são pertinentes para a caracterização de componentes que promovem interações biológicas com a superfície de Ti, incluindo técnicas microscópicas, espectroscópicas e difração de raios-X, além das que avaliam as propriedades superficiais do biomateriais: rugosidade, molhabilidade e energia livre de superfície.

1.4.1 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica desenvolvida por Binning, Quate e Gerber em 1986, e que permite a obtenção de imagens reais, em três dimensões, da topografia de superfícies não-condutoras com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas⁸⁰.

O princípio fundamental da técnica AFM consiste na varredura da superfície das amostras com uma sonda denominada cantilever, que consiste em uma ponta de dimensões atômicas, composta geralmente por grafite, integrada a um braço em movimento. A sonda de AFM segue os contornos da superfície. Durante o deslocamento da ponta, o computador analisa, em cada posição na superfície, a força de interação entre a ponta de AFM e a amostra e constrói o diagrama das alturas, construindo assim a topografia da amostra.

Uma característica importante da técnica é a facilidade de preparação da amostra em comparação com outras técnicas de obtenção de imagem, como as Microscopia Eletrônica de Varredura ou Transmissão^{81,82}.

A técnica de AFM possui inúmeras modificações que oferecem informações, por exemplo, de bicamadas depositadas em suportes sólidos ou sobre a interação entre proteínas e superfícies de nanomateriais⁸³. No estudo pioneiro de 1992⁸⁴, bicamadas lipídicas de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE) e 1,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) depositadas em suporte de mica foram fotografadas, revelando a coexistência de domínios lipídicos.

Também utilizando suporte de mica Richter et al.⁸⁵ caracterizaram a formação de bicamadas lipídicas como modelos de membranas celulares usando misturas de lipídeos

zwitteriônico, negativamente e positivamente carregados. Em outros estudos^{77,86}, padrões topográficos de camadas de colágeno adsorvido em filmes LB foram obtidos por AFM, evidenciando que esta técnica também pode fornecer informações sobre sistemas que incluam a adsorção de proteínas.

1.4.2 Espectroscopia de Infravermelho

As técnicas espectroscópicas de análises na região do infravermelho se baseiam na interação da radiação eletromagnética com a matéria, permitindo a obtenção de informações relacionadas com os diferentes tipos de ligações químicas das estruturas⁷⁹. Esta radiação possui baixa energia e, portanto não promove transições eletrônicas no material.

As análises mais comuns por espectroscopia no infravermelho são realizadas em equipamentos capazes de separar variações na frequência da radiação que chega ao detector utilizando-se a transformada de Fourier (FTIR)⁸⁷. Nesses espectrofotômetros, a radiação infravermelha emitida passa por um interferômetro antes de incidir na amostra. Um gráfico de intensidade em função de deslocamento (de um espelho móvel) é gerado quando a radiação que não é absorvida pela amostra incide em um detector. Utilizando assim a transformada de Fourier, este sinal é transformado em um espectro que representa o número de fótons detectados em função da frequência de radiação.

As análises de FTIR também podem ser realizadas por reflexão total atenuada (ATR)^{53,88}. Basicamente, esse modo de análise permite a reflexão de um feixe incidente em um determinado ângulo crítico que passa de um cristal para a amostra. Assim, uma

parcela da radiação incidente penetra levemente na amostra (na ordem de microns). Ocorrendo a absorção da radiação pela amostra, o feixe sofre atenuação, onde é possível a identificação das bandas de absorção da amostra, e consequentemente, as ligações químicas presentes em seus compostos.

A espectroscopia de infravermelho já vem sendo utilizada em sistemas estruturais semelhantes ao tecido ósseo⁸⁸, possibilitando a obtenção de informações sobre os minerais e proteínas como o colágeno⁸⁹, obtendo uma compreensão molecular das superfícies bem como sua composição, de forma rápida e não destrutiva.

A utilização da espectroscopia ATR-FTIR nas análises de superfícies metálicas, que não podem ser analisadas no modo transmissão, também já foi bastante explorada. Destaca-se o enfoque para a utilização na caracterização de filmes LB^{6,53,79,90} bem como, estudos composição de proteínas adsorvidas em superfícies modificadas por essa técnicas⁹¹⁻⁹³.

1.4.3 Difração de Raios-X

A técnica de difração de raios-X (DRX) é utilizada na determinação das fases cristalinas presentes nos materiais, uma vez que nos cristais, os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios-X que, ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de elétrons de um átomo.

A interação dos raios-X com os planos de átomos presentes na amostra origina o fenômeno de difração estudado inicialmente por Bragg, a qual estabelece a relação entre

o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram que são característicos para cada fase cristalina, segundo a equação $n\lambda = 2d\sin\theta$, onde n corresponde a um número inteiro, λ é o comprimento de onda dos raios-X incidentes, d é a distância interplanar e θ trata-se do ângulo de difração.

Quando a diferença de caminho ótico entre dois feixes é igual a um número inteiro de comprimentos de onda, isto significa que as ondas estão em fase, ou seja, os máximos e mínimos de uma onda coincidem com os máximos e mínimos da outra. Quando a lei de Bragg não é satisfeita, isto é, quando a diferença de caminho ótico não é um número inteiro de comprimentos de onda, as ondas estão fora de fase, e os efeitos dessa difração dos raios-X pode ser observado.

Como vantagem, a técnica de difração de raios-X para a caracterização de fases cristalinas, apresenta grande confiabilidade dos resultados obtidos, pois o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina.

Em se tratando especificamente de amostras de HAp, estas podem se analisadas na forma de pó, como no caso do trabalho realizado por Tas⁹⁴, que analisou a pureza da fase e os níveis de cristalinidade HAp; ou aderidas em filmes finos como no estudo de Sato et al⁹⁵ que, por meio da técnica de DRX, verificou influência de grupos carboxil em filmes LB ao controlar as propriedades cristalográficas dos nanocristais de HAp.

1.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

O princípio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) consiste na interação de um feixe de elétrons com o material a ser analisado permitindo a obtenção de uma imagem ampliada e tri-dimensional. O feixe de elétrons é gerado e acelerado através de uma diferença de potencial e conduzido à uma câmara evacuada que contém a amostra. Este feixe de elétrons, ao focalizar um ponto da amostra, gera sinais elétricos que são captados e amplificados, gerando a imagem.

A MEV tem sido utilizada em larga escala para a avaliação da morfologia de minerais formados^{30,67,96} ou células aderidas sobre as superfícies dos biomateriais no processo de mineralização⁹⁷, além da morfologia das fibrilas de colágeno^{98,99}.

1.4.5 Propriedades Superficiais: Rugosidade, ângulo de contato e Energia Superficial

Algumas características superficiais dos materiais candidatos a implantes como hidrofobicidade, rugosidade, composição, energia de superfície e toxicidade devem ser moduladas de forma a acelerar o processo de osteogênese¹⁰⁰.

A topografia da superfície é caracterizada pela rugosidade e área superficial em escala micro e nanométrica, mantendo uma relação direta com a adesão, proliferação e diferenciação de células em biomateriais^{17,101}.

Para implantes direcionados à substituição óssea, processos relacionados à osteointegração e à osteogênese, são diretamente dependentes da rugosidade da superfície¹⁰², sendo relatado que tais processos podem se iniciar mais facilmente em superfícies rugosas quando comparados com superfícies lisas¹⁰³.

Isso ocorre pois a presença de elementos topográficos na superfície (defeitos) podem constituir pontos de ancoragem para células ou promover a adsorção de proteínas^{104–106}. Alguns estudos revelam essa tendência em superfícies de Ti com topografia em nível nanométrico, que possuem uma maior influência na diferenciação de osteoblastos e adesão de proteínas quando com outros níveis topográficos¹⁰⁷.

A rugosidade como medida da textura da superfície, pode ser quantificada por meio dos desvios verticais da superfície real em relação à uma superfície ideal. O parâmetro mais utilizado, pois descreve variações da altura da amostra, é a rugosidade aritmética média (R_a)¹⁰⁸. Este é definido como o desvio médio absoluto das irregularidades comparado à linha média traçada sobre um dado comprimento de amostragem, sendo a função $y(x)$ o perfil das irregularidades, evidenciado na Figura 7, que mostra também a equação para o cálculo da R_a .

$$R_a = \frac{1}{l} \int_0^l |y(x)| dx$$

Figura 7: Ilustração e equação para a determinação da rugosidade aritmética

Outra propriedade superficial importante é a molhabilidade, definida como a capacidade de um líquido se espalhar sobre uma superfície sólida. A medida quantitativa da molhabilidade é dada pelo ângulo de contato, que são inversamente proporcionais.

Em um sistema trifásico sólido, líquido e gás, quando uma gota é colocada sobre uma superfície sólida, o ângulo de contato (θ) se dá pelo balanço das forças horizontais que atuam em equilíbrio. Este sistema é descrito, pela equação de Young, como o resultado do balanço entre das tensões interfaciais da gota de um líquido e um sólido (γ_{SL}), o sólido e o gás (γ_{SG}) e entre o líquido e o gás (γ_{LG}), que é a tensão superficial do líquido puro, como mostrado na Figura 8.

Figura 8: a) ângulo de contato (θ_c) entre uma gota e a superfície sólida e as tensões interfaciais envolvidas e b) Equação de Young.

A propriedade relacionada com a molhabilidade é a energia livre de superfície (γ_{SG}). Os átomos ou moléculas do interior de um material estão completamente circundados por outros átomos/moléculas semelhantes. Porém, os átomos da superfície apresentam menor número de átomos vizinhos. Tal fenômeno proporciona à região superficial um excesso de energia, conhecida como energia livre superficial no caso de sólido, ou apenas tensão superficial (γ_{LG}) no caso dos líquidos. Para uma superfície sólida, mede-se θ_c usando líquidos de polaridades diferentes, e assumindo que

interações na interface sólido-líquido ocorre somente entre forças de mesma natureza, calcula-se γ_{SG} , bem como suas componentes polares e dispersivas. O tratamento matemático será evidenciado na seção experimental.

Estudos sobre o papel da energia superficial em superfícies de Ti utilizadas em implantes ósseos teve início na década de 80¹⁰⁹⁻¹¹¹, onde os pesquisadores observaram que amostras com alta energia de superfície, possuíam camadas de proteínas com uma espessura maior do que as com baixa energia. Feng et al.¹¹² ainda evidencia que a componente polar da energia superficial em superfícies de Ti tem maior influência no comportamento de osteoblastos (adesão e proliferação) do que a componente apolar.

2. Parte Experimental

2.1 Materiais

Os fosfolipídeos utilizados para formação das matrizes biomiméticas foram 1,2-Dipalmitoil-*sn*-3-Glicero-Fosfatidilcolina (DPPC, Avanti, 734,05 g.mol⁻¹, >99%) e ácido octadecilfosfônico, (OPA, Sigma, 334,47 g.mol⁻¹, 99%). Estes tensoativos foram solublizados em uma solução composta de clorofórmio e metanol em uma razão 7:3 v/v, (Metanol grau HPLC-J.T.Baker, 99,90%; clorofórmio grau HPLC- Sigma, 99,0%), em concentração 1,0x10⁻³ mol.L⁻¹.

OPA é um fosfolipídeo aniônico formado por uma cabeça polar e cauda apolar de constituída por 18 carbonos. Sua estrutura simples (representada na Figura 9-a) é de grande valia para estudos de interações interfaciais em monocamadas de Langmuir^{113,90}.

Fosfatidilcolinas constituem o principal grupo carregado encontrado em membranas celulares e por isso, DPPC é utilizado na maior parte dos trabalhos envolvendo sistemas modelo^{57,114,115}. DPPC é um lipídeo de membrana, representando cerca de 50% da massa total dos fosfolipídios^{116,117}. É formado por uma cabeça polar que contém um grupo colina (HO-CH₂-CH₂-N⁺ ≡ (CH₃)₃) e duas caudas de ácidos palmíticos (cadeia acíclica de 16 carbonos). Trata-se de um fosfolipídeo zwitteriônico onde o grupo fosfato tem carga negativa em pH=7 e o grupo colina é carregado positivamente. Sua estrutura é representada na Figura 9-b.

Figura 9: Estruturas químicas dos fosfolipídeos a) OPA e b) DPPC

Os sais utilizados no preparo das soluções aquosas utilizadas na subfase, solução tampão pH 7,5, no SBF e na solução de colágeno estão descritos abaixo: Cloreto de Cálciodiidratado (Merck, 99,5%, $147,02 \text{ g.mol}^{-1}$), Cloreto de sódio (Synth, 99,5%, Bicarbonato de sódio (AZ Labor, 99,5%), Cloreto de potássio (Nuclear, 99,0%), Fosfato de sódio dibásico heptaidratado (Mallinckrodt Chemicals, 99,5%), Cloreto de magnésio hexaidratado (Synth, 99,0%), Sulfato de sódio (Merck) e *trishidroximetilaminometano* (Sigma, 99,9%, $121,14 \text{ g.mol}^{-1}$), Colágeno tipo-I (pele de bezerro, para cultura de células, Sigma- Aldrich), Ácido acético glacial (VETEC, 99,9%) e n-propanol (VETEC, 99,0%).

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada Milli-Q® e a limpeza de toda vidraria foi realizada utilizando uma solução $7\text{H}_2\text{SO}_4: 3\text{H}_2\text{O}_2$ (solução piranha).

2.2 Preparo da solução de colágeno

Foram dissolvidos 3 mg de colágeno tipo- I em misturas de 4,5 mL de ácido acético (5mmol.L⁻¹) e 0,5 mL de n-propanol e mantido a 25°C sob agitação por pelo menos 12 horas, seguindo procedimento já descrito na literatura descrito⁹³. A conformação desta proteína foi estudada por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (Espectropolarímetro JASCO J-810-DQ/FFCLRP). As amostras foram analisadas a 25 °C e os espectros registrado de 180 nm a 270 nm, a uma velocidade de 1 nm/s. Os resultados foram obtidos como elipticidade molar $[\theta]$, usando a relação: $[\theta] = 10^{-3} \theta M/LC$ (deg.cm².dmol⁻¹), onde θ é a elipticidade medida em graus, L é o comprimento da cubeta em milímetros, C é a concentração em mg/ml e M é a massa molar média dos resíduos de colágeno cujo valor é 91,0 g/mol.

2.3 Isotermas de Pressão de Superfície

Foram obtidas isotermas a $23,0 \pm 1^\circ\text{C}$ utilizando-se água Milli-Q® e 1,0 mmol.L⁻¹ de CaCl₂ como subfase para os fosfolipídeos OPA e DPPC. Para isto, volumes adequados das soluções clorofórmicas de OPA e DPPC foram espalhados na superfície da subfase aquosa, em uma Cuba de Langmuir de dimensões 270x170x15 mm (Insight, Brasil). Para estudar o efeito da incorporação do colágeno nas monocamadas, 2 mmol.L⁻¹ da solução proteica foram injetada a subfase aquosa em proporção 1:1 com o volume de lipídeo espalhado.

Os valores da razão área/número de moléculas em cada estágio de compressão foram calculados pelo software do equipamento por meio dos valores de concentração, volume da solução de lipídio espalhado e área total da cuba. A área média ocupada por molécula foi calculada graficamente ajustando-se uma tangente aos pontos correspondentes ao estado líquido-condensado da monocamada.

2.4 Pré-tratamento dos Suportes metálicos

Foram utilizados discos de Ti de 13 mm de diâmetro (REALUM-Brasil) para a deposição dos filmes LB. Anteriormente ao processo de deposição dos filmes, esses suportes foram imersos por 15 minutos à temperatura ambiente, em ultrassom, em 3 diferentes líquidos de limpeza: água contendo detergente, etanol e acetona. Após essa primeira etapa, esses substratos foram submersos em solução $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ pH 7,5 contendo o tensoativo não-iônico Span 20 4×10^{-5} mol/L, por 5 minutos à 65°C em ultrassom de forma a se garantir sua limpeza. Em seguida os suportes foram enxaguados exaustivamente com água Milli-Q®.

2.5 Formação das matrizes orgânicas

As matrizes orgânicas molecularmente organizadas foram depositadas sobre os suportes de Ti utilizando-se a técnica LB. Também por meio dessa técnica a proteína colágeno tipo-I foi inserida aos filmes. Para a deposição, após a compressão até $\pi=30$

mN m^{-1} a monocamada foi transferida para o suporte sólido, com o auxílio de um sistema *dip-coater* mantendo-se a velocidade de imersão e emersão constante em $0,038 \text{ mm s}^{-1}$.

Foram depositados filmes tipo-Y contendo uma bicamada de fosfolípídeo, com final hidrofílico (Figura 10-a), que foram rapidamente imersos em em soluções CaCl_2 1 mmol.L^{-1} e tampão ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7,5 e 100 mmol.L^{-1}) por 12 horas, cada uma, em um total de 4 ciclos, à 37°C . Posteriormente, com o intuito de se avaliar a bioatividade, esses mesmos suportes foram submersos 12 horas na solução de SBF, como exemplificado na Figura 10-b.

Figura 10: a) Esquema de formação de filmes tipo Y e (b) procedimento para o crescimento de fosfato de cálcio e testes de bioatividade sobre os filmes LB.

2.6 Preparo do SBF

Os suportes contendo as matrizes orgânicas, após a exposição ao tampão fosfato, foram imersos em SBF. Esta solução contém sais, em concentrações

semelhantes às aquelas encontradas no plasma sanguíneo humano. Estudos *in vitro* mostraram que a exposição dos suportes em SBF pode ser utilizada para reproduzir a formação de hidroxiapatita *in vivo*⁹⁴, sendo bom indicativo na escolha dos filmes potencialmente utilizáveis para o estudo do crescimento de osteoblastos. Para o preparo do SBF seguiu-se os procedimentos reportados na literatura^{94,118}.

Brevemente, os sais descritos na Tabela 3 e o tris foram adicionados à água Milli-Q e o pH foi ajustado para 7,4 utilizando-se uma solução de HCl 1 mol.L⁻¹ a uma temperatura de 37° C.

Tabela 3: Ordem de adição dos reagentes para o preparo de 500 ml da solução SBF

Ordem de Adição	Reagentes	Massa Utilizada (g)
1	NaCl	3,274
2	NaHCO ₃	1,134
3	KCl	0,186
4	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0,134
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,152
6	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,184
7	Na ₂ SO ₄	0,036
8	Tris	3,028

2.7 Caracterização das superfícies

2.7.1 Caracterização Morfológica

A inserção de colágeno nos filmes LB depositados sobre mica foi evidenciada por AFM, no modo contato, utilizando-se o equipamento Shimadzu-SPM 9600 (DQ-FFCLRP). A textura dos filmes formados sobre a superfície de Ti antes e após

exposição a SBF foi avaliada por medidas de rugosidade, utilizando-se o software Gwyddion 2.36.

Para a caracterização morfológica das superfícies modificadas utilizou-se a técnica MEV, (Shimadzu, Super Scan- SS550, DQ/FFCLRP). As amostras foram recobertas com um filme de ouro antes das análises utilizando-se evaporadora Bal-Tec SCD-050 Sputter Coater.

2.7.2 Análise Química

Espectros ATR-FTIR para análise dos grupos químicos presentes nos filmes depositados sobre Ti, foram obtidos, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu Prestige (Laboratório de Terras Raras- DQ/FFCLRP). Além disso, analisou-se a composição química das superfícies (razão Ca/P) e nódulos de mineração utilizando-se o acessório de EDS acoplado ao MEV, que permite a análise da energia dispersiva de raios-X característica emitida por cada átomo que compõe o filme.

2.7.3 Caracterização da fase mineral

Utilizou-se DRX (difratômetro Bruker-AXS D5005 DQ/FFCLRP) com ângulo de incidência rasante para avaliação da fase mineral formada sobre as superfícies de Ti tendo como fonte tubo selado de Cu (2,2 kW) com um filtro monocromador de níquel

cuja radiação gerada possui $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. As amostras foram obtidas à uma velocidade de varredura de $0,005^\circ/\text{segundo}$.

2.7.4 Molhabilidade e Energia Livre de Superfície dos Filmes LB

A molhabilidade das superfícies de titânio, tal como a energia livre de superfície (SFE) das amostras foi verificada por medidas de ângulo de contato estático (θ) utilizando-se o equipamento DataPhysics OCA20 disponível em nosso laboratório. Para determinar a SFE das amostras foi medido θ de três líquidos de diferentes polaridades (diiodometano, água, e formamida), utilizando a equação de Owens-Wendt-Kaeble^{119,120}.

$$\gamma_{LG}(1 + \cos\theta) = (\gamma_L^d \gamma_S^d)^{1/2} + 2(\gamma_L^p \gamma_S^p)^{1/2}$$

onde S e L determinam as superfícies sólidas e líquidas, respectivamente, e γ_d e γ_p correspondem às componentes dispersiva e polar energia de superfície total superfície (γ), respectivamente. A SFE é calculada pela soma de suas componentes dispersiva e polar.

2.8 Viabilidade de osteoblastos

Os testes de viabilidade celular foram realizadas em colaboração com o Prof. Pietro Ciancaglini no Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada: Sistemas Miméticos

de Biomembranas – USP – Ribeirão Preto. Antes da cultura de células, os filmes foram esterilizados durante 2 minutos em uma câmara de limpeza por plasma (Plasma Harrick PDC-32G), usando N₂ (g). Células do osso de ratos foram isoladas e cultivadas seguindo o método descrito por Maniatopoulos et al.¹²¹, e com as modificações propostas por Simão et al.²⁵. Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método clássico do MTT. O sal tetrazolium, [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium], produz um composto altamente colorido, formazan, pela redução com NADH, que reflete a atividade da desidrogenase celular. Para investigar a toxicidade dos discos de Ti modificados com um filme LB de OPA e DPPC contendo a fase inorgânica de fosfato de cálcio, 2×10⁴ células de osteoblastos suspensas em 1 mL de meio de cultura foram adicionadas em cada amostra. Estas culturas foram incubadas por 7 e 14 dias.

Posteriormente, uma solução de MTT 1.0 mg/mL (1.0 mL por poço) foi adicionada ao meio contendo a cultura de células seguido por incubação por 4 horas, a 37°C. Os cristais formados, devido à interação entre a desidrogenase mitocondrial e o reagente MTT, foram dissolvidos em 2-propanol e agitadas até completa dissolução. Em seguida as absorbâncias foram lidas, 560 e 690 nm, em um espectrofotômetro - Genesys 2, para a determinação da desidrogenase mitocondrial e do MTT, respectivamente. A viabilidade celular foi expressada como porcentagem de células vivas comparadas com o controle.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise conformacional do colágeno tipo-I

A conformação das moléculas de colágeno tipo-I, em solução contendo ácido acético/ n-propanol, foi investigada por Espectroscopia de Dicroísmo Circular. O espectro mostrado na Figura 11 revela um pico negativo obtido em 198 nm e um pico positivo em 221 nm, característica da estrutura helicoidal tripla de colágeno⁸⁶, mostrando que a conformação nativa da proteína foi mantida.

Figura 11: Espectro de Dicroísmo Circular de colágeno tipo-I em n-propanol/ácido acético (1:9), pH = 4,3 a 20°C.

3.2 Monocamadas de Langmuir de OPA e DPPC

A Figura 12 mostra as isotermas de pressão se superfície para OPA e DPPC em subfase contendo água pura e em subfase contendo CaCl_2 1 mmol.L⁻¹, na presença e na ausência da solução 2 μM de colágeno.

Figura 12: Isotermas de pressão de superfície vs área por molécula para a) OPA e b) DPPC em subfase contendo água pura ($\bullet$), água+ colágeno ($\circ$), CaCl_2 1 mmolL^{-1} ($\blacksquare$) e CaCl_2 1 mmolL^{-1} + colágeno ($\square$). O encarte mostra a isoterma de pressão de superfície da solução de colágeno injetado na subfase contendo água pura na ausência das monocamadas.

A diminuição da área mínima ocupada por molécula de $23 \text{ \AA}^2$ para $19 \text{ \AA}^2$ na monocamada de OPA na presença da subfase aquosa contendo CaCl_2 , mostrada na Figura 12-a, é atribuída ao fato de que os cátions divalentes interagem com a cabeça polar carregada negativamente do lipídeo, diminuindo a repulsão e, portanto, permitindo maior empacotamento das moléculas⁶⁸. Para as monocamadas de DPPC (Figura 12-b), observa-se expansão da monocamada e aumento da área mínima em presença de CaCl_2 , comparada à isoterma obtida em água. Devido à incorporação de íons de Ca^{2+} , a área mínima por molécula de DPPC aumentou de $58 \text{ \AA}^2$ para $61 \text{ \AA}^2$. Ainda, observa-se que a transição de fase LC-LE ocorre em π maiores, mostrando que os domínios lipídicos são mais tensoativos em presença do cátion. Os íons Ca^{2+} , interagem preferencialmente com o grupo fosfatidil, carregado negativamente, presente na cabeça polar zwitteriônica do DPPC.

Desta forma, as interações repulsivas entre as cabeças polares do lipídeo, causada pelo desbalanceamento de cargas da região polar da molécula, são aumentadas, causando expansão da monocamada e aumento na área mínima ocupada pelas moléculas de DPPC¹¹⁷. Enquanto que para o OPA a presença de íons Ca^{2+} promove um empacotamento mais eficiente das monocamadas, garantindo uma maior estabilidade para a formação dos filmes LB, para o DPPC, a subfase aquosa contendo CaCl_2 foi utilizada para a formação dos filmes apenas para ser fonte de Ca^{2+} para o crescimento dos fosfatos.

Nas isotermas π -A das monocamadas de OPA e DPPC em água pura e em subfase contendo $2 \text{ \mu M}$ de colágeno (Figura 12), é observado que para ambos lipídeos a injeção de proteína na subfase causa expansão das monocamadas de $23 \text{ \AA}^2$ para $29 \text{ \AA}^2$, para o OPA e de $58 \text{ \AA}^2$, para $68 \text{ \AA}^2$ para o DPPC. Este fato pode ser explicado pela

migração das moléculas de colágeno para a interface, o que evidencia sua interação com fosfolípídeo estudado.

A mesma tendência é observada para as isotermas $\pi x A$ das monocamadas de OPA e DPPC, obtidos na subfase aquosa contendo CaCl_2 após a injeção de colágeno. A isoterma obtida para o colágeno, na ausência da monocamada lipídica (encarte Figura 12-b), mostra que esta proteína exibe baixa atividade superficial. Porém, a presença de lipídios na interface promove sua inserção nas monocamadas e permite sua transferência aos filmes LB, como será mostrada nas próximas sessões. Uma representação esquemática da inserção da proteína nas monocamadas é mostrada na Figura 13.

Figura 13: Representação esquemática da interação lipídeo-proteína na interface líquido-ar.

A estabilidade das monocamadas em presença e ausência de proteína foi investigada por meio do estudo da variação de π em função do tempo. Os experimentos foram realizados a partir de π inicial = 30 mN.m^{-1} , utilizado também para a transferência das monocamadas.

A Figura 14 mostra a influência do colágeno na estabilidade das monocamadas quando estas são formadas em água pura ou em uma subfase aquosa contendo CaCl_2 1 mmol.L^{-1} . Reduções em π (aumento de γ) em função de tempo podem ser interpretadas

como diminuição da quantidade de lipídios adsorvidos na interface, podendo estes migrar para o interior da solução na forma de agregados, ou ainda, a formação de bicamadas na interface ar/água. Para ambas subfases, observou-se que as monocamadas de DPPC, são mais estáveis na presença da proteína. Este resultado está de acordo com o fato da proteína interagir com os lipídeos e migrar para interface, resultando em monocamadas formadas na fase LC em estágios mais elevados de organização¹¹⁴. Para o OPA, a desestabilização causada pela presença do íon Ca^{2+} na subfase é minimizada pela adição de colágeno.

Figura 14: Estabilidade das monocamadas de a) OPA e b) DPPC quando o colágeno é injetado em água pura, ou na subfase CaCl_2 1 mmol.L⁻¹.

3.3 Estudo da incorporação de colágeno nos filmes LB

A técnica de AFM é largamente utilizada para obter informações sobre a textura e morfologia de superfícies. Sua resolução em escala de poucos nanômetros permite análise detalhada de agregados de lipídeos depositados por meio da técnica LB⁸⁵.

Inicialmente, a morfologia das fibras de colágeno transferidas para suportes de mica na cuba de Langmuir, na ausência das monocamadas fosfolipídicas (Figura 15-a) foi analisada e comparadas com as imagens obtidas apenas gotejando a solução de colágeno na mica (Figura 15-b). Observa-se na Figura 15-a que a transferência por meio da técnica LB promove desagregação das fibras que podem ser individualmente identificadas com diâmetros que variam de 50 à 100 nm, em concordância com dados da literatura^{77,122}. Alguns estudos também relatam que os principais domínios da tripla hélice do colágeno são lipofílicos⁷¹, favorecendo a adsorção da proteína em superfícies hidrofóbicas, como a mica.

O processo de gotejamento (Figura 15-b) causa grande agregação. Estes resultados ressaltam a potencialidade da técnica LB para a obtenção de filmes contendo proteínas homogeneamente distribuídas em sua extensão.

Figura 15: Imagem de AFM do a) filme de colágeno transferido para o suporte de mica por meio da técnica LB e b) colágeno gotejado na mica.

As monocamadas de OPA e DPPC formadas em subfase aquosa, na presença ou não de colágeno foram depositados sobre a superfície de mica e as suas imagens captadas por AFM são mostradas na Figura 16.

Figura 16: Micrografias de força atômica em mica de filmes de OPA (a,b) e DPPC (c,d) na ausência (a,c) e na presença (b,d) de colágeno na matriz lipídica.

Para os lipídios estudados observa-se, na ausência de colágeno, a formação de domínios micrométricos típicos destas bicamadas⁸¹ (Figura 16-a e Figura 16-c). A altura média desses domínios, inferior a dezenas de nanômetros, está de acordo com dados reportados na literatura⁸⁵.

Em presença de colágeno (Figura 16-b e Figura 16-d), observam-se estruturas fibrilares, típica desta proteína, recobrando o suporte de mica. A estrutura do colágeno aderido à bicamada é notavelmente dependente do tipo de lipídio utilizado e pode ser atribuído à diferença de ligação da proteína às cabeças polares zwitteriônicas e negativamente carregadas do DPPC e OPA, respectivamente.

Para o OPA, aparentemente, maior quantidade de colágeno está ligada à superfície da bicamada. Além disso, para este lipídeo observa-se a diminuição do diâmetro médio das fibras quando comparado às amostras de colágeno depositadas na ausência do lipídeo (Figura 15-a). O diâmetro próximo 20 nanômetros agora é compatível com o das fibrilas desta proteína, anteriormente à sua agregação na forma de fibras⁷⁷. Para o DPPC esta desagregação não é evidente (Figura 16-d).

O ponto-isoelétrico da proteína, determinado por medidas da variação do potencial-zeta da solução de colágeno em função do pH é 5,58 (Figura 17).

Figura 17: Ponto isoelétrico do colágeno obtido por medidas de potencial zeta.

Portanto, no pH de trabalho, próximo de 5,5 a mesma possui carga neutra. Desta forma, interações eletrostáticas são desfavorecidas quando comparadas a outros tipo de interações intermoleculares.

A constituição dos resíduos de aminoácidos na estrutura do colágeno é dado pela sequência Gly-Pro-Hipro. Nota-se portanto a possibilidade de interação via ligações de hidrogênio a partir cabeça polar do OPA, que possui um grupo OH disponível para interagir por esta via, enquanto o grupo colina do DPPC desfavorece este tipo de interação. Este fato pode justificar o aumento na quantidade de colágeno aderida ao filme LB de OPA.

Além disso, como mostrado na Figura 12, a área ocupada por molécula de OPA em $\pi=30$ mN/m (pressão na qual os filmes foram transferidos) é menor do que para o DPPC em presença de colágeno, o que torna a densidade superficial (moléculas/área) maior para o OPA.

A topografia das superfícies de Ti formada com filmes LB contendo 2 camadas de OPA e DPPC, com e sem colágeno, recobertas com o mineral formado por meio da exposição dos discos a ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato (pH 7,5) e SBF(37°C) por 12 h, também foi analisada por AFM (Figura 18). Nota-se a formação um recobrimento particulado contínuo ao longo das superfícies expostas à SBF independente da presença de colágeno. Porém, a presença da proteína (Figura 18-b e Figura 18-d) leva à diminuição da distância entre as partículas originando filmes mais densos. A literatura relata que a formação de hidroxiapatita *in vivo* ocorre direcionada pelas fibrilas de colágeno^{123,124}, onde a matriz de colágeno serve como molde para a nucleação e o crescimento de apatitas em escala manométricas, que distribuídas uniformemente sobre a matriz proteica.

Além disso, a geometria das partículas formada parece ser dependente do tipo de fosfolípido utilizado. Para OPA (Figura 18-b) observa-se a formação de partículas

mais alongadas, enquanto que geometrias esféricas são observadas nas partículas formadas a partir de DPPC (Figura 18-d).

As imagens de AFM dos filmes obtidos antes da formação mineral (Figura 16) mostram que OPA e DPPC se organizam de maneiras distintas na interface. Este fato explica a formação de partículas morfologicamente distintas nos dois casos.

A literatura relata dois mecanismos de biomineralização em sistemas modelo formado por fosfolipídeos em monocamadas de Langmuir^{125,126}. Na primeira abordagem, os padrões cristalográficos são determinados pela relação entre o espaçamento atômico em uma face de um cristal e a distância entre os grupos funcionais organizados na matriz orgânica. A segunda proposta é evidenciada pela estereoquímica da interface matriz orgânica/cristal quando os íons inorgânicos são ligado aos grupos funcionais da matriz orgânica, onde essa matriz resultante equivale a uma estrutura cristalina específica, que conduz a um mínimo de energia interfacial necessário a nucleação.

O resultados obtidos para OPA e DPPC evidenciam estes mecanismos: partículas menores são formadas para o lipídeo OPA, com menor área mínima e, portanto menor distanciamento entre os íons Ca^{2+} ligados ao lipídeo no filme LB (Figura 18-a). Para o DPPC, com maior área mínima, partículas maiores e mais definidas são formadas (Figura 18-c). Além disso, em presença de colágeno as partículas formadas são mais alongadas (Figura 18-b), mostrando a influência da estereoquímica interfacial na geometria das partículas.

Para cada tipo de recobrimento, foram calculados os valores de rugosidade aritmética média (R_a) e área superficial. Este parâmetro bem como as diferenças com

relação a altura dos filmes para os dois lipídeos utilizados, na presença e na ausência de colágeno, serão discutidos posteriormente.

Figura 18: Imagens de Microscopia de Força Atômica das superfícies de Ti modificadas com os filmes de OPA (a e b) e DPPC (c e d) após a formação da fase mineral e exposição a SBF(37°C) por 12h, na ausência (a e c) e na presença (b e d) de colágeno na subfase de formação dos filmes LB.

3.4 Análise Estrutural e Composicional dos filmes LB

3.4.1 ATR-FTIR

Diversos trabalhos^{15,95,127-129} contendo compósitos a base de hidroxiapatita e/ou colágeno apresentam bandas de absorção no espectro infravermelho semelhantes às obtidas para o osso, mostrado na Figura 19.

Figura 19: Espectro de absorção no infravermelho da amostra de osso humano utilizada nesse trabalho.

Os principais grupos identificados nesses trabalhos, bem como na amostra de osso são: os modos de vibração do fosfato ν_1 e ν_3 na região de 900-1180 cm⁻¹ e ν_4 em 604 cm⁻¹; do carbonato ν_4 em 960 cm⁻¹ e ν_2 na região de 1560-1410 cm⁻¹. São encontrados também a banda de absorção da amida I (1680-1600 cm⁻¹), amida II (1580-

1480 cm^{-1}), amida III (1300-1200 cm^{-1}) e colágeno (1355, 1283 e 1203 cm^{-1}), além do estiramento do grupo O-H presente em 3500 cm^{-1} .

A Figura 20 compara os espectros ATR-FTIR das amostras de Ti contendo OPA (Figura 20a) e DPPC (Figura 20b), com e sem colágeno, expostas nos ciclos CaCl_2 1 mmol.L^{-1} e tampão fosfato (pH 7,5) e por 12 h à SBF.

Figura 20: Espectros de ATR-FTIR de discos de Ti modificados com a) OPA e b) DPPC, na presença (linha vermelha) e na ausência de colágeno (linha preta) após a exposição a CaCl_2 /tampão fosfato e por 12 horas em SBF. A linha verde mostra o espectro obtido para uma amostra de osso humano, para fins de comparação. Os encartes representam regiões ampliadas no espectro.

Os espectros dos recobrimentos obtidos na ausência de colágeno (linha preta) diferem dos obtidos para a amostra contendo colágeno (linha vermelha). É possível

observar no encarte da Figura 19, linha vermelha, as bandas amida I, II e III em 1600 cm^{-1} , 1480 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} , respectivamente.

Para os dois filmes lipídicos, contendo ou não colágeno, destaca-se a presença da banda estreita e intensa em 1100 cm^{-1} atribuída ao estiramento ν_3 do grupo fosfato^{130,131}. A banda larga que aparece por volta de 3500 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração da ligação OH presente na apatita, uma vez que as amostras foram mantidas em dessecador para retirada de água.

Nota-se ainda, que os espectros apresentam bandas na região de 1420 a 1480 cm^{-1} . A presença dessas bandas indica incorporação de carbonato à fase inorgânica, relatada na literatura¹³¹ como substituições do Tipo-B, em que o PO_4^{3-} é substituído por CO_3^{2-} na estrutura de apatitas. Esse tipo de substituição é comum no sistema biológico, sendo relatado que a formação de apatitas carbonatadas em implantes favorece a fixação desses biomateriais no tecido ósseo^{127,128}.

Estas mesmas bandas podem ser observadas no espectro da amostra de osso, evidenciando a similaridade entre os materiais biomiméticos obtidos e o tecido ósseo natural. Além disso, a presença de íons CO_3^{2-} na estrutura da HAp alteram a cristalinidade da estrutura bem como o tamanho do cristal^{35,132}. A formação de cristais de menor tamanho provoca um aumento na área superficial e um alargamento dos picos de difração, fatos estes evidenciados e discutidos nas próximas seções.

3.4.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X

A composição química dos recobrimentos depositados sobre as superfícies de Ti foi avaliada por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS). Os valores das razões molares Ca/P dos filmes LB formados com OPA e DPPC, com e sem colágeno, expostos a ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato (pH 7,5) e SBF estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de razão molar Ca/P obtidos por EDX

Filme LB	Razão Molar Ca/P
OPA/tampão	0,90
OPA/tampão/colágeno	0,70
OPA/SBF	1,42
OPA/SBF/colágeno	1,42
DPPC/tampão	1,10
DPPC/tampão/colágeno	1,10
DPPC/SBF	1,30
DPPC/SFB/colágeno	1,40

Os resultados mostram que a exposição de todas as amostras obtidas aos ciclos Ca^{2+} /Tampão Fosfato (pH 7,5) e à SBF, leva a um aumento da razão molar Ca/P até aproximadamente 1,4 que é próximo à razão molar da HAp estequiométrica (1,67).

Para os filmes LB modificados com OPA, não houve diferença nos valores obtidos em relação à presença de colágeno, indicando que o resultado da razão molar Ca/P de 1,4 foi obtido devido a exposição das amostras à SBF. Para o DPPC o aumento de 1,3 das amostras sem colágeno para 1,4 para os filmes formados na presença da proteína, pode ser considerado um indício de que o colágeno contido nos filmes

proporciona valores de razão molar Ca/P próximos aos encontrados na HAp estequiométrica^{28,133}.

A razão molar reduzida pode estar relacionada com a substituição de íons Ca^{2+} por Mg^{2+} , elemento também presente nos espectros de EDS, com exemplificado na Figura 21 que traz um espectro de EDS para a amostra de DPPC contendo colágeno. Esta substituição também ocorre no tecido ósseo natural. Desta forma, podemos concluir que os minerais formados exibem substituição de ânions e cátions análogas às observadas em meio biológico.

Figura 21: Espectro de EDS da amostra de DPPC contendo colágeno.

3.4.3 Difração de Raios-X

A fase mineral do filme depositado sobre a superfície de Ti foi investigada por DRX. As Figura 22-a e Figura 22-b comparam os padrões de raios-X dos recobrimentos contendo duas camadas de filmes LB de OPA e DPPC, respectivamente, após ciclos de

exposição a soluções de Ca^{2+} /tampão de fosfato (pH 7,5) e SBF(37°C) durante 12 horas, na ausência (linha preta) e na presença (linha vermelha) de colágeno, com uma amostra de osso humano (linha verde).

Os padrões de DRX para os discos de Ti contendo OPA, na presença e na ausência de colágeno coincidem com o padrão JCPDS 00-009-0432 (I)-hidroxilapatite, syn - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ com célula unitária hexagonal e parâmetros de rede $a=b=9.41800$ e $c=6.88400$ - alfa 90.000 - 90.000 beta - gamma 120.000, os mesmos obtidos para o osso humano.

Já, para a amostra de DPPC obtida na ausência de colágeno o padrão obtido coincide com JCPDS 01-086-1203 (N) - Hydroxylapatite, syn - $\text{Ca}_{9,04}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$ com célula unitária Hexagonal e parâmetros de rede - a 9.42600 - b 9.42600 - c 6.86500 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gama 120.000 (razão molar Ca/P de 1,51), distinto do obtido para o osso humano. Por outro lado, a amostra obtida na presença de colágeno está, de acordo com o padrão 00-009-0432 (I) -em hidroxilapatite, syn - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, também hexagonal porém com parâmetros de rede levemente distintos - a 9.41800 - b 9.41800 - c 6.88400. Para este lipídeo, a presença da proteína no filme leva à formação da mesma fase mineral, porém estruturalmente distinta.

Fosfolípidos à base de fosfatidilcolinas são os principais constituintes da membrana celular, ao passo que o colágeno é a principal proteína no tecido ósseo^{98,116}. Desta forma, é importante evidenciar que a presença de colágeno tipo-I em sistemas biomiméticos contendo DPPC foi essencial para a formação de uma fase mineral semelhante ao osso natural. A presença dos filmes de LB de OPA e DPPC sobre a superfície de Ti promove mineralização de HAp semelhante ao osso natural, indicando

que, além de bioativas estas superfícies mimetizam o osso humano na composição e em estrutura.

Figura 22: Padrões de difração das superfícies de titânio modificadas com 2 camadas de filme LB-OPA(a) ou LB-DPPC(b) após exposição a solução de SBF(37°C) por 12 h na presença (linha vermelha) e na ausência (linha preta) de colágeno, comparadas com do padrão de difração do osso humano (linha verde). Os picos marcados com * correspondem ao suporte de Ti.

3.5 Análise morfológica

De Souza et al.⁶⁸ mostraram que na ausência dos filmes LB, a exposição de Ti em SBF leva à formação de partículas isoladas de HAp, revelando a importância da presença da matriz orgânica na interconexão de partículas para a formação de filmes contínuos e homogêneos. A Figura 23 revelou que a exposição das superfícies de Ti

modificadas com filme LB a Ca^{2+} /tampão fosfato (pH 7,5) promoveu o crescimento de filmes com estrutura tipo folha para os dois fosfolipídeos utilizados (Figura 23-a e c).

Após a exposição desses filmes à solução SBF (37°C) por 12h ocorreu uma mudança morfológica e dimensional dos recobrimento. A estruturação de partículas nanométricas em forma de agulhas é típica da hidroxiapatita, corroborando os resultados das análises espectroscópicas.

Os filmes expostos à SBF são formados por estruturas nanométricas que se agrupam formando um recobrimento particulado, contínuo e homogêneo. Nota-se que a geometria destas partículas difere entre os lipídios utilizados no filme LB: tipo agulha para OPA(Figura 23-b) e esféricas para DPPC(Figura 23-d). Estes resultados evidenciam o mecanismo de biomineralização baseado na disposição interfacial dos íons formadores das células unitárias dos minerais, capazes de influenciar os processos de nucleação e direcionar o crescimento do cristal de maneiras distintas¹³⁴.

Figura 23: Imagens de MEV das superfícies de Ti modificadas com o filme LB de OPA (a e b) e DPPC (c e d) expostos a ciclos Ca^{2+} /tampão fosfato antes (a e c) e após (b e d) a exposição à solução SBF(37°C) por 12h.

Na presença de colágeno nos filmes LB, também foram formados filmes nanoestruturados de HAp contínuos e homogêneos (Figura 24), também com estruturas distintas dependentes do tipo de lipídeo utilizado. A diferença entre estas partículas reside, especialmente, nas suas dimensões. Estas estruturas assemelham-se às obtidas

por Sato et al.⁹⁵ no estudo caracterização de crescimento dos cristais HAp microestruturados, utilizando como substrato cristais de fluoreto de cálcio e lâminas de vidro de sílica fundida; bem como no trabalho de Xia et al.¹⁵, onde se investigou os mecanismos de formação de apatitas sobre os discos de Ti₆Al₄V contendo colágeno, obtendo informações sobre o papel da proteína na formação de revestimentos biomiméticos.

Nesse último, obteve-se a comparação da morfologia de superfícies composta por apatita pura e apatita/colágeno. O tamanho das estruturas nestes revestimentos foram significativamente diferentes, sendo o diâmetro médio da glóbulos para a apatita pura cerca de 10 vezes maior que nos substratos contendo colágeno.

As amostras de OPA expostas à SFB na presença de colágeno (Figura 24-a, Figura 24-b e Figura 24-c) observa-se a formação de agregados esféricos de partículas dentro de glóbulos com tamanhos na ordem de poucas dezenas de nanômetros e se assemelham àquelas obtidas pela exposição à SBF na ausência de colágeno (Figura 23-b).

Para o DPPC, a presença de colágeno também leva a formação de nanopartículas de HAp, porém agregadas em formatos cilíndricos, que remetem à estrutura da proteína (Figura 24-d, Figura 24-e e Figura 24-f). Este resultado evidencia a influência da estereoquímica superficial no processo de biomineralização na matriz de DPPC. Além disso, a caracterização por DRX (Figura 22-b) mostra que estas partículas são estruturalmente semelhantes à HAp biológica.

Figura 24: Imagens de MEV das superfícies de Ti modificadas com o filme LB de OPA (a, b e c) e DPPC(d, e e f) contendo colágeno após exposição a ciclos Ca^{2+} /tampão fosfato e à solução SBF (37°C) por 12h.

3.6 Avaliação da textura e propriedades superficiais do Ti modificado

Para descrever a textura das superfícies de Ti modificadas, os parâmetros de rugosidade média aritmética (Ra) e a área de superfície (AS) foram investigados e estão descritos na Tabela 5. Todos os filmes LB depositados sobre Ti, modificados na ausência e na presença de colágeno, mostraram aumento de Ra bem como de AS, quando comparado com amostra de Ti sem o recobrimento.

Os filmes formados com OPA/colágeno na superfície do Ti expostos a ciclos de Ca^{2+} /tampão fosfato (pH 7,5) e SBF (37°) por 12 horas resultou em aumento da Ra e AS em relação às amostras contendo apenas OPA e submetidas ao mesmo

procedimento para o crescimento de mineral. Esse aumento ocorre devido à presença das partículas nanométricas. O crescimento de partículas de HAp sobre os filmes formados com colágeno cria um perfil de superfície diferente.

Para o DPPC, os revestimentos formados na ausência de colágeno apresentavam aumento Ra e AS em comparação com o revestimento que contém a proteína. Este resultado pode ser explicado pelo crescimento organizado de HAp, guiada pelas fibras de colágeno, o que impede o crescimento no eixo z, resultando em redução das alturas médias. Essa tendência também foi observada nas imagens de AFM dos filmes LB-DPPC/colágeno na mica (Figura 16-d).

A Tabela 5 também traz os valores totais de energia livre de superfície (SFE), bem como suas componentes polar (γ^p) e dispersiva (γ^d), e os ângulos de contato (θ) das superfícies obtidos com água Milli-Q, para o Ti sem o recobrimento, e o Ti revestido com os filmes de OPA e DPPC, exposto à solução de SBF, na presença e ausência de colágeno.

O estudo da SFE, tal como suas componentes, é um fator chave relacionado às possíveis interações entre as superfícies de Ti e o tecido hospedeiro¹⁴. A modificação de implantes utilizando abordagens biomimética tem como objetivo aumentar a afinidade entre o metal e o meio biológico¹³⁵. Em especial, o aumento dos valores de (γ^p) favorece o contato entre as primeiras células ósseas e a superfície do material, visto que superfícies com características hidrofílicas ligam-se às proteínas, um componente comum da matriz extracelular, o que promove adesão celular mais eficiente¹⁴.

Os valores de SFE para o Ti não-recoberto ficaram em torno de 49 mJ.m^{-2} , e esta próxima aos encontrados na literatura^{112,136}. Observou-se um aumento desses valores quando as amostras de Ti foram modificadas, indicando uma maior propensão das

superfícies em participar das reações bioquímicas primordiais para integração metal/tecido.

Vários autores têm explorado os efeitos da SFE de metais e ligas de metal, principalmente relacionando esses valores com o crescimento de osteoblastos nesses materiais. Feng et al.¹¹², constatou que, a proliferação de osteoblastos de coelho em superfícies de Ti tratadas termicamente em várias atmosferas de oxidação, aumenta os valores de rugosidade da superfície bem como a SFE .

Tais parâmetros promoveram um maior número de células aderidas e maior atividade de fosfatase alcalina. De Souza et al.⁶⁸ mostraram que a deposição de HAp sobre filmes LB contendo fosfolípido aniônico resulta maior SFE maior quando comparado a superfície de Ti puro, e também teve sua componente polar aumentada. Nesse mesmo estudo, a formação uma fase mineral de fosfato de cálcio influenciou no aumento dos valores de SFE.

Para ambos os fosfolípidos estudados, na presença ou na ausência de colágeno, os valores de SFE encontram-se próximos quando os desvios são considerados, indicando que o aumento ocorre devido ao crescimento de HAp na superfície, após a exposição das amostras aos SBF. Este aumento resultou em uma melhora na molhabilidade da superfície conforme revelado pelos baixos valores de ângulo de contato (θ) com água. O aumento na hidrofilicidade , associado ao aumento de γ^p , corrobora com o aumento da adesão de osteoblastos na superfície, evidenciados em ensaios de viabilidade celular, discutido na próxima seção.

Tabela 5: Parâmetros de Rugosidade (R_a), Área Superficial (AS), Energia Livre de Superfície(SFE) e suas componentes dispersiva (γ^d) e polar (γ^p) e ângulo de contato com a água (θ) do Ti limpo e das superfícies de Ti modificadas

	$R_a(\text{nm})$	$AS(\mu\text{m}^2)$	$\text{SFE} (\text{mJ m}^{-2})$	$\gamma^p (\text{mJ m}^{-2})$	$\gamma^d (\text{mJ m}^{-2})$	$\theta (^{\circ})$
Titânio puro	33.0	25.4	49.2± 1.2	17.8± 1.6	31.4± 0.3	58.2± 0.6
OPA/SBF	78.8	33.0	71.3± 1.0	41.7± 1.9	29.6± 0.5	4.1± 0.4
OPA/SBF/colágeno	113.7	29.2	71.8± 1.6	41.8± 1.7	30.0± 0.9	3.0± 0.2
DPPC/SBF	133.6	29.2	70.2± 1.0	43.8± 0.6	26.3± 1.8	8.3± 0.3
DPPC/SBF/colágeno	89.6	27.2	69.9± 0.9	45.7± 0.9	24.1± 0.2	6.8± 0.1

3.7. Viabilidade Celular

A proliferação de osteoblastos em superfícies revestidas por colágeno e/ou Hap tem sido alvo de estudos durante muitos anos^{68,97}. No entanto, o crescimento de osteoblastos em Ti revestido por filmes biomiméticos utilizados nesta pesquisa é pouco relatado na literatura⁶⁸.

Neste trabalho, antes da realização de todos os experimentos de viabilidade celular, os filmes foram esterilizados durante 2 minutos no interior de um limpador de superfícies por plasma (Harrick Plasma PDC-32G), utilizando-se N_{2(g)}.

Os filmes submetidos a este ensaio foram: OPA e DPPC, com e sem colágeno, que formaram a camada de HAp biomimética após a exposição à SBF, depositados sobre Ti. A Figura 25 mostra o gráfico obtido para a viabilidade celular após 7 e 14 dias de cultura. Os resultados foram calculados em porcentagem de células viáveis em comparação ao controle de plástico.

A osteogênese é dividida em 3 etapas: adesão, proliferação e crescimento celular. A topografia do suporte onde as células crescem desempenha um papel crucial na primeira etapa, enquanto que a natureza química da superfície influencia a proliferação e a diferenciação¹⁷.

O primeiro contato da célula com as superfícies rugosas resultou em uma tensão inicial que levou à redução da viabilidade em relação às superfícies do controle. Assim, os resultados mostram que após 7 dias, o Ti não-modificado tal como o filme OPA/SBF, com e sem colágeno, apresentaram viabilidade celular reduzidas. Porém, após 14 dias de cultura, a proliferação foi acelerada guiada pela química de superfície

biomimética⁹⁶, e os valores aumentaram para 193% para o filme sem colágeno para e 209% nos filmes formados com colágeno, enquanto que o Ti não-modificado teve aumento inferior a 175%.

Os valores de viabilidade obtidos para os filmes LB-DPPC sem colágeno na fase de proliferação das células (dia 7) não variam significativamente em relação ao controle. No entanto, para este mesmo período, o filme formado com colágeno reduz a viabilidade dos osteoblastos.

Após 14 dias, os valores obtidos para DPPC em presença de colágeno se assemelham aos valores obtidos para os filmes de OPA, que formam a mesma fase mineral de HAp.

Já o filmes de DPPC sem colágeno foi o que resultou em maior viabilidade, mostrando que o principal efeito na proliferação celular é a presença da fase inorgânica biomimética. Comparada ao filme de DPPC com colágeno, esta amostra também é a que apresenta maior valor de Ra e AS (Tabela 5) o que melhorou o contato da célula com o filme. Este conjunto de dados revela que a composição química da camada externa adicionada à morfologia dos revestimentos são os principais parâmetros que direcionam a proliferação de osteoblastos em superfícies metálicas.

Assim, fatores como formação de estruturas nanoparticuladas homogêneas, associados a composição biomimética de HAp formada sobre a superfície de Ti modificada com filme LB, foram otimizados e melhorados quando a principal proteína constituinte do osso humano foi inserida aos filmes. Além disso, apesar da formação de fases minerais distintas nos filmes de OPA e DPPC, as amostras que apresentaram maiores porcentagens de viabilidade de osteoblastos são aquelas que também possuíam

elevados valores das principais propriedades superficiais: rugosidade, energia livre de superfície (componente polar) e ângulo de contato.

Figura 25: Teste de viabilidade celular com crescimento de osteoblastos por 7 e 14 dias das amostras de titânio não modificados, dos discos modificados com os filmes LB-OPA e LB-DPPC, exposto a 4 ciclos de solução aquosa CaCl_2 /tampão fosfato e 24 horas em SBF e dos discos modificados com os filmes LB-OPA e LB-DPPC + Colágeno, exposto a 4 ciclos de solução aquosa CaCl_2 /tampão fosfato e SBF por 24 horas.

4. Conclusões e Perspectivas

A influência da incorporação de colágeno na formação de filmes LB depositados sobre suportes de Ti foi estudada, podendo ser investigados os efeitos dessa proteína na composição e propriedades físico-químicas das matrizes no crescimento de biominais.

Quanto ao estudo das propriedades interfaciais de monocamadas de Langmuir de OPA e DPPC na presença de colágeno, foi constatado que este, embora possua baixa atividade superficial, pode interagir com fosfolípidos na interface ar-líquido por meio da técnica de Langmuir. Também foi possível a transferência dos fosfolípidos juntamente com a proteína para suportes de titânio e formação dos filmes LB.

A presença da matriz orgânica formada por fosfolípidos aniônicos e zwitteriônicos permitiu a deposição de filmes contínuos de HAp em superfícies de Ti quando estas foram expostas à SBF. Para o OPA, a formação de HAp biomimética ocorreu independente da presença do colágeno, enquanto que, para as superfícies modificadas com filmes LD de DPPC, a presença da proteína foi essencial para a formação do biomaterial.

Devido à composição e textura das amostras modificadas com filmes LB e colágeno, os revestimentos apresentaram alta ELS e molhabilidade com relação aos discos de Ti não modificados. Estes parâmetros são cada vez mais requeridos para aplicações biomédicas, a fim de melhorar o processo de osteointegração.

Os aumentos da viabilidade de osteoblastos na fase de proliferação é relacionado principalmente à química e área superficial dos revestimentos. As partículas de HAp de ordem nanométrica foram formadas nas amostras que obtiveram elevada área

superficial. Essas propriedades são essenciais para a integração desses materiais no tecido ósseo humano.

Esta dissertação apresentou resultados obtidos a partir das atividades exercidas no projeto de mestrado financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os resultados permitiram a apresentação de trabalhos em congressos nacionais e internacionais. Como perspectivas futuras, pretende-se publicar os resultados apresentados nessa dissertação.

Referências

1. Helmus, M. N. & Tweden, K. in *Encycl. Handb. Biomater. Bioeng. Part A* 1429–1463 (1995).
2. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–2953 (2008).
3. Kawachi, E. Y., Bertran, C. A., Reis, R. R. dos & Alves, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quim. Nova* **23**, 518–522 (2000).
4. Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 1487–1510 (1991).
5. Bioengineering, D. Review Tissue-biomaterial interactions. **22**, 3421–3445 (1987).
6. 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).
7. Ramos, A. P., Espimpolo, D. M. & Zaniquelli, M. E. D. Influence of the type of phospholipid head and of the conformation of the polyelectrolyte on the growth of calcium carbonate thin films on LB/LbL matrices. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **95**, 178–185 (2012).
8. Albrektsson, T., Brånemark, P.-I., Hansson, H. -a. & Lindström, J. Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man. *Acta Orthop.* **52**, 155–170 (1981).
9. Kurella, A. & Dahotre, N. B. *Surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering. J. Biomater. Appl.* **20**, 5–50 (2005).
10. Kokubo, T., Kim, H.-M., Kawashita, M. & Nakamura, T. Bioactive metals: preparation and properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**, 99–107 (2004).
11. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A. & Maffulli, N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J. Orthop. Surg. Res.* **9**, 18 (2014).
12. Albrektsson, T. & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* **10**, 96–101 (2001).

13. Rautray, T. R., Narayanan, R. & Kim, K.-H. Ion implantation of titanium based biomaterials. *Prog. Mater. Sci.* **56**, 1137–1177 (2011).
14. Gentleman, M. M. & Gentleman, E. The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions. *Int. Mater. Rev.* **59**, 417–429 (2014).
15. Xia, Z., Yu, X. & Wei, M. Biomimetic collagen/apatite coating formation on Ti6Al4V substrates. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **100**, 871–881 (2012).
16. Barrere, F., Blitterswijk, C. A. Van, Groot, K. De & Layrolle, P. Nucleation of biomimetic Ca – P coatings on Ti6Al4V from a SBFx 5 solution : influence of magnesium. **23**, 2211–2220 (2002).
17. Jalota, S., Bhaduri, S. B. & Tas, a. C. Osteoblast proliferation on neat and apatite-like calcium phosphate-coated titanium foam scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **27**, 432–440 (2007).
18. Eisenbarth, E., Meyle, J., Nachtigall, W. & Breme, J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials* **17**, 1399–1403 (1996).
19. Liu, X., Chu, P. & Ding, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **47**, 49–121 (2004).
20. Markovic, M., Fowler, B. O. & Tung, M. S. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **109**, 553 (2004).
21. Aizenberg, J. Crystallization in Patterns: A Bio-Inspired Approach. *Adv. Mater.* **16**, 1295–1302 (2004).
22. Le Guéhennec, L., Soueidan, a, Layrolle, P. & Amouriq, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.* **23**, 844–54 (2007).
23. Palin, E., Liu, H. & Webster, T. J. Mimicking the nanofeatures of bone increases bone-forming cell adhesion and proliferation. *Nanotechnology* **16**, 1828–1835 (2005).
24. Tzaphlidou, M. Bone architecture: collagen structure and calcium/phosphorus maps. *J. Biol. Phys.* **34**, 39–49 (2008).
25. Simão, A. M. S. *et al.* Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **146**, 679–687 (2007).

26. Tirrell, M., Kokkoli, E. & Biesalski, M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surf. Sci.* **500**, 61–83 (2002).
27. Westbroek, P. & Marin, F. A marriage of bone and nacre. *Nature* **392**, 861–862 (1998).
28. Pina, S., Oliveira, J. M. & Reis, R. L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Adv. Mater.* 1143–1169 (2015).
29. Manero, J. M. *et al.* Growth of bioactive surfaces on titanium and its alloys for orthopaedic and dental implants. **22**, 53–60 (2002).
30. Olszta, M. J. *et al.* Bone structure and formation: A new perspective. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **58**, 77–116 (2007).
31. Nair, A. K., Gautieri, A., Chang, S.-W. & Buehler, M. J. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nat. Commun.* **4**, 1–9 (2013).
32. Stevens, M. M. & George, J. H. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* **310**, 1135–1138 (2005).
33. Guastaldi, A. C. & Aparecida, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim. Nova* **33**, 1352–1358 (2010).
34. Aoki, H. *Science and Medical Application of hydroxyapatite*. (JAAS, 1991).
35. LeGeros, R. Z. in *Monogr. ral Sci.* (Meyers, H. M.) 1–201 (Karger, 1991).
36. Oguchi, H., Ishikawa, K., Mizoue, K., Seto, K. & Eguchi, G. Long-term histological evaluation of hydroxyapatite ceramics in humans. **16**, 33–38 (1995).
37. Vaidyanathan, J., Vaidyanathan, T., Ramasubbu, N. & Ravichandran, S. A Computational and Experimental Analysis of Ligand Binding to Type 1 Collagen. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **1**, 397–422 (2005).
38. Dong, X., Wang, Q., Wu, T. & Pan, H. Understanding adsorption-desorption dynamics of BMP-2 on hydroxyapatite (001) surface. *Biophys. J.* **93**, 750–759 (2007).
39. Wang, Y., Yang, C., Chen, X. & Zhao, N. Biomimetic Formation of Hydroxyapatite/collagen Matrix Composite. *Adv. Eng. Mater.* **8**, 97–100 (2006).
40. Cen, L. *et al.* Collagen Tissue Engineering : Development of Novel Biomaterials. *Pediatr. Res.* **63**, 492–496 (2008).

41. Hubbel J. A. Biomaterials in Tissue Engineering. *Nature* 565–576 (1995).
42. Canty, E. G. & Kadler, K. E. Procollagen trafficking , processing and fibrillogenesis. (2005).
43. Chu, M., Myers, J. C., Bernard, M. P., Ding, J. & Ramirez, F. Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human proalpha1(I) collagen chain. *Nucleic Acids Res.* **10**, 5925–5934 (1982).
44. Grant, M. E. From collagen chemistry towards cell therapy - a personal journey. *Int. J. Exp. Pathol.* **88**, 203–214 (2007).
45. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. p. 156-369 (Artmed, 2011).
46. Pathak, P., Katiyar, V. K. & Giri, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. *J Nanotechnol. Online* **3**, (2007).
47. Ehrvar, M. M., Is, C. B., Charer, J. M. S., Oung, M. M. & Uong, J. H. L. Fiber-Optic Biosensors . *Trends and Advances.* **16**, (2000).
48. M., B. J. Innovation inspired by nature Biomimicry. *Ind. Ecol.* 127–129 (2006).
49. Detanico, F. B., Teixeira, F. G. & Silva, T. K. A Biomimética como Método Criativo para o Projeto de Produto. *Des. Tecnol.* **2**, 101–113 (2010).
50. Banakar, U. V in *Pharm. dissolution Test.* 437 (1992).
51. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part i. Solids. *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 2221–2295 (1916).
52. Blodgett, K. B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 1007–1022 (1935).
53. Schwartz, D. K. Langmuir-Blodgett film structure. *Surf. Sci. Rep.* **27**, 245–334 (1997).
54. Paul, S. *et al.* Langmuir–Blodgett Film Deposition of Metallic Nanoparticles and Their Application to Electronic Memory Structures. *Nano Lett.* **3**, 533–536 (2003).
55. Paterno, L. G., Dema-ufscar, D. D. E. D. M. & Sp, S. C. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. *Quim. Nov.* **24**, 228–235 (2001).

-
56. Plant, A. L. Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics. *Langmuir* **15**, 5128–5135 (1999).
 57. Torrano, A. a, Pereira, Â. S., Oliveira, O. N. & Barros-Timmons, A. Probing the interaction of oppositely charged gold nanoparticles with DPPG and DPPC Langmuir monolayers as cell membrane models. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **108**, 120–6 (2013).
 58. Girard-Egrot, A. P. & Blum, L. J. in *Nanobiotechnology Biomim. Membr.* **1**, 23–74. Springer US, (2007).
 59. Yasui, K., Uegaki, M., Shiraki, K. & Ishimizu, T. Enhanced solubilization of membrane proteins by alkylamines and polyamines. *Protein Sci.* (2010).
 60. Ciancaglini, P. *et al.* Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophys. Rev.* **4**, 67–81 (2012).
 61. Maria E. D. Zaniquelli, W. A. B. e A. J. M. H. Construção de uma Cuba de Langmuir para Preparação e Estudo de Monocamadas Líquidas. *Quim. Nov.* **16**, 229–233 (1992).
 62. Barnes, G. T. & Gentle, I. R. *Interfacial Science: an introduction.* 10–20 (2011).
 63. Mann, S., Heywood, B. R., Rajam, S. & Walker, J. B. A. Structural and stereochemical relationships between Langmuir monolayers and calcium carbonate nucleation. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **24**, 154–164 (1991).
 64. Xue, Z.-H., Hu, B.-B., Dai, S.-X. & Du, Z.-L. Templated biomineralization of Au nanoplates under bovine serum albumin Langmuir monolayers. *Mater. Chem. Phys.* **123**, 278–283 (2010).
 65. Xue, Z. *et al.* Crystallization and self-assembly of calcium carbonate under albumin Langmuir monolayers. *Mater. Chem. Phys.* **129**, 315–321 (2011).
 66. Mann, S. *et al.* Crystal synthesis under langmuir monolayers. *Adv. Mater.* **2**, 257–261 (1990).
 67. Costa, N. & Maquis, P. M. Biomimetic processing of calcium phosphate coating. *Med. Eng. Phys.* **20**, 602–606 (1998).
 68. Souza, I. D. De *et al.* Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate – LB film as template. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **118**, 31–40 (2014).
 69. Wen, H. B. *et al.* Fast precipitation of calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments. *Biomaterials* **18**, 1471–1478 (1997).

-
70. Yamada, S., Nakamura, T., Kokubo, T., Oka, M. & Yamamuro, T. Osteoclastic resorption of apatite formed on apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic by a simulated body fluid. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 1357–1363 (1994).
 71. Dupont-gillain, C. H. C. *et al.* Controlling the supramolecular organisation of adsorbed collagen layers. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **5**, 347–353 (2004).
 72. Penners, G., Priel, Z. & Silberberg, a. Irreversible adsorption of triple-helical soluble collagen monomers from solution to glass and other surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **80**, 437–444 (1981).
 73. Chernoff, E. a. G. Atomic force microscope images of collagen fibers. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **10**, 596 (1992).
 74. Graham, J. S., Vomund, A. N., Phillips, C. L. & Grandbois, M. Structural changes in human type I collagen fibrils investigated by force spectroscopy. *Exp. Cell Res.* **299**, 335–342 (2004).
 75. Dupont-gillain, C. C., Rouxhet, P. G. & Lou, V. V. Modulable Nanometer-Scale Surface Architecture Using Spin-Coating on an Adsorbed Collagen Layer. *Nano Lett.* **1**, 245–251 (2001).
 76. Deyme, M., Baszkin, a, Proust, J. E., Perez, E. & Boissonnade, M. M. Collagen at interfaces. I. In situ collagen adsorption at solution/air and solution/polymer interfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **20**, 951–962 (1986).
 77. Chen, Q., Xu, S., Li, R., Liang, X. & Liu, H. Network structure of collagen layers absorbed on LB film. *J. Colloid Interface Sci.* **316**, 1–9 (2007).
 78. Ferreira, M. *et al.* Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). *Quím N* **28**, 502–510 (2005).
 79. Liu, H. & Webster, T. J. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* **28**, 354–69 (2007).
 80. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
 81. El Kirat, K., Morandat, S. & Dufrêne, Y. F. Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 750–765 (2010).
 82. Müller, D. J. & Dufrêne, Y. F. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 261–269 (2008).

-
83. Dufrêne, Y. F. Towards nanomicrobiology using atomic force microscopy. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 674–680 (2008).
 84. Weisenhorn, A. L., Schmitt, F.-J., Knoll, W. & Hansma, P. K. Streptavidin binding observed with an atomic force microscope. *Ultramicroscopy* **42-44**, 1125–1132 (1992).
 85. Richter, R. P. & Brisson, A. R. Following the Formation of Supported Lipid Bilayers on Mica: A Study Combining AFM, QCM-D and Ellipsometry. *Biophys. J.* **88**, 3422–3433 (2005).
 86. Tenboll, A. *et al.* Controlled deposition of highly oriented type I collagen mimicking in vivo collagen structures. *Langmuir* **26**, 12165–72 (2010).
 87. Von Aulock, F. W. *et al.* Advances in Fourier transform infrared spectroscopy of natural glasses: From sample preparation to data analysis. *Lithos* **206-207**, 52–64 (2014).
 88. Kazarian, S. G. & Chan, K. L. A. ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. *Analyst* **138**, 1940–1951 (2013).
 89. Boskey, A. & Pleshko Camacho, N. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials* **28**, 2465–2478 (2007).
 90. Fanucci, G. E. *et al.* Organic/inorganic Langmuir–Blodgett films based on known layered solids: divalent and trivalent metal phosphonates. *Thin Solid Films* **327-329**, 331–335 (1998).
 91. Das, K. & Kundu, S. Adsorption and conformation variation of BSA protein with the size variation of the metallic nanoparticles in LB film. **468**, 56–61 (2015).
 92. Girard-Egrot, A. P., Godoy, S., Chauvet, J.-P., Boullanger, P. & Coulet, P. R. Preferential orientation of an immunoglobulin in a glycolipid monolayer controlled by the disintegration kinetics of proteo-lipidic vesicles spread at an air–buffer interface. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1617**, 39–51 (2003).
 93. Usha, R., Dhathathreyan, A., Mandal, a. B. & Ramasami, T. Behavior of collagen films in presence of structure modifiers at solid-liquid interface. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **42**, 3859–3865 (2004).
 94. Tas, a C. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 degrees C in synthetic body fluids. *Biomaterials* **21**, 1429–38 (2000).
 95. Sato, K., Kogure, T., Kumagai, Y. & Tanaka, J. Crystal Orientation of Hydroxyapatite Induced by Ordered Carboxyl Groups. *J. Colloid Interface Sci.* **240**, 133–138 (2001).

-
96. 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**, 285–295 (2005).
 97. Van den Dolder, J. & Jansen, J. A. The response of osteoblast-like cells towards collagen type I coating immobilized by p-nitrophenylchloroformate to titanium. *J. Biomed. Mater. Res. A* **83**, 712–719 (2007).
 98. Gobeaux, F. *et al.* Fibrillogenesis in dense collagen solutions: a physicochemical study. *J. Mol. Biol.* **376**, 1509–1522 (2008).
 99. Allegretti, L. J. M. & Bertran, C. a. The Effect of Collagen Matrix on Calcium Phosphate Mineralization. *Key Eng. Mater.* **396-398**, 195–198 (2009).
 100. Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, J. L. Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor. *Biomater. Sci.* 1–20 (2004).
 101. Anchorage, D. B. in *Acta Orthop. Scand.* 155–170 (1981).
 102. 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).
 103. 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**, 1349–1357 (2005).
 104. Lampin, M., Warocquier-Clérout, R., 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).
 105. 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**, 475–483 (2000).
 106. 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).
 107. 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).
 108. Gadelmawla, E. S., Koura, M. M., Maksoud, T. M. A., Elewa, I. M. & Soliman, H. H. Roughness parameters. *J. Mater. Process. Technol.* **123**, 133–145 (2002).

109. Baier, R. E. & Meyer, A. E. Implant surface preparation. *Int. J. Maxillofac. Impl.* **3**, 9–20 (1988).
110. Hartman, L. C. Effects of pretreatment sterilization and cleaning methods on materials properties and osseointegration of a threaded implant. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **4**, 11–18 (1989).
111. Bagnall, R. D. & Arundel, P. A. A method for the prediction of protein adsorption on implant surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **17**, 459–466 (1983).
112. Feng, B., Weng, J., Yang, B. C., Qu, S. X. & Zhang, X. D. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials* **24**, 4663–4670 (2003).
113. Kanta, a., Sedev, R. & Ralston, J. The formation and stability of self-assembled monolayers of octadecylphosphonic acid on titania. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **291**, 51–58 (2006).
114. Zhang, H., Wang, X., Cui, G. & Li, J. Stability investigation of the mixed DPPC/protein monolayer at the air–water interface. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **175**, 77–82 (2000).
115. Estrela-lopis, I., Brezesinski, G. & Möhwald, H. Miscibility of DPPC and DPPA in monolayers at the air / water interface. *Chem. Phys. Lipid* **131**, 71–80 (2004).
116. Daum, G. Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **822**, 1–42 (1985).
117. Lee, Y.-L., Lin, J.-Y. & Chang, C.-H. Thermodynamic characteristics and Langmuir-Blodgett deposition behavior of mixed DPPA/DPPC monolayers at air/liquid interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **296**, 647–654 (2006).
118. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **27**, 2907–2915 (2006).
119. Owens, D. K. & Wendt, R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **13**, 1741–1747 (1969).
120. Kaelble, D. H. Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids. *J. Adhes.* **2**, 66–81 (1970).
121. 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).

-
122. Jiang, F., Hörber, H., Howard, J. & Müller, D. J. Assembly of collagen into microribbons: effects of pH and electrolytes. *J. Struct. Biol.* **148**, 268–278 (2004).
 123. Calvert, P. D. in *Mater. Sci. Eng.* 69–74 (1994).
 124. Du, C., Cui, F. Z., Zhu, X. D. & de Groot, K. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J. Biomed. Mater. Res.* **44**, 407–415 (1999).
 125. Mann, S. Molecular recognition in biomineralization. *Nature* **332**, 119–124 (1988).
 126. Addadi, L. & Weiner, S. Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4110–4114 (1985).
 127. Barrère, F. *et al.* In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants. *J. Biomed. Mater. Res. A* **64**, 378–387 (2003).
 128. Habibovic, P., Barre, F., Blitterswijk, C. A. Van & Groot, K. De. Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants. **22**, 517–522 (2002).
 129. Dorozhkina, E. I. & Dorozhkin, S. V. Surface mineralisation of hydroxyapatite in modified simulated body fluid (mSBF) with higher amounts of hydrogencarbonate ions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **210**, 41–48 (2002).
 130. Ślósarczyk, A., Paszkiewicz, Z. & Paluszkiwicz, C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J. Mol. Struct.* **744-747**, 657–661 (2005).
 131. Hua Cheng, Z., Yasukawa, A., Kandori, K. & Ishikawa, T. FTIR Study on incorporation of CO₂ into calcium hydroxyapatite. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **94**, 1501–1505 (1998).
 132. Hench, L. L. & Wilson, J. *An Introduction to Bioceramics*. 396 (1993).
 133. Zhang, L.-J. *et al.* Mineralization mechanism of calcium phosphates under three kinds of Langmuir monolayers. *Langmuir* **20**, 2243–9 (2004).
 134. Ibuki, F. K. Síntese e caracterização de hidroxiapatita funcionalizadas e análise da interação destas com o tecido dentinário. 197 (2014).
 135. Castner, D. G. & Ratner, B. D. *Biomedical surface science: Foundations to frontiers. Surf. Sci.* **500**, 28–60 (2002).

-
136. Zhao, L., Mei, S., Chu, P. K., Zhang, Y. & Wu, Z. The influence of hierarchical hybrid micro/nano-textured titanium surface with titania nanotubes on osteoblast functions. *Biomaterials* **31**, 5072–5082 (2010).