

VIABILIDADE CELULAR DE OSTEOBLASTOS HUMANOS EM FILMES DE CARBONO TIPO-DIAMANTE COM DIÓXIDO DE TITÂNIO

C.A.G.S. Oliveira¹, B.N. Cavalcanti², F.C. Silva¹, V.J. Trava-Airoldi³, A.O. Lobo¹, F.R. Marciano¹

¹ Laboratório de Nanotecnologia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba (Univap), Av. Shishima Hifumi 2911, São José dos Campos, 12244-000, SP, Brasil.

² Laboratório de Biologia Celular, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Av. Eng. Francisco José Longo 777, São José dos Campos, 12245-492, SP, Brasil.

³ Laboratório Associado de Sensores e Materiais, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), Av. dos Astronautas 1758, São José dos Campos, 12227-010, SP, Brasil.

e-mail: cilianafatea@gmail.com

Resumo: Biomateriais nanoestruturados são promissores pelo fato de apresentarem similaridades com componentes nanoestruturados de matriz extracelular. Os filmes de carbono-tipo diamante (DLC) são atualmente de grande interesse da comunidade científica e tecnológica devido às suas propriedades, como baixo coeficiente de atrito, elevada dureza, inércia química, alta aderência a superfícies metálicas com diferentes formas e obtenção em grandes escalas. Entretanto, suas propriedades podem ser significativamente aumentadas pela presença de nanopartículas em sua estrutura, com substanciais mudanças em suas propriedades tribológicas e mecânicas. O objetivo deste trabalho é avaliar a citotoxicidade e a citocompatibilidade *in vitro*, em culturas celulares de osteoblastos humanos, dos filmes de DLC contendo nanopartículas de TiO₂ visando a aplicabilidade do novo compósito na medicina ósseo-regenerativa. Os filmes foram depositados utilizando-se a técnica de deposição química da fase vapor assistida por plasma. O ensaio de citotoxicidade indicou que todos os grupos contendo DLC e TiO₂-DLC tiveram crescimento regular das células de modo semelhante ao grupo de controle negativo. A atividade de fosfatase alcalina dos grupos amostrais estudados revela que os revestimentos de DLC e TiO₂-DLC tiveram comportamentos semelhantes nos mesmos meios de tratamento. Com isso, conclui-se que os filmes de TiO₂-DLC apresentam grande potencial e viabilidade para futuras aplicações biomédicas.

Palavras-chave: citotoxicidade, citocompatibilidade, carbono tipo-diamante, dióxido de titânio, osteoblastos humanos.

Abstract: Nanostructured biomaterials are promising because their similarities with nanostructured components of the extracellular matrix. Diamond-like carbon (DLC) films are currently of great interest to the scientific and technological community due to its properties such as low friction coefficient, high hardness, chemical inertness, high adhesion to metal surfaces with different forms and in obtaining large

scales. However, DLC properties can be significantly enhanced by the presence of nanoparticles in their structure, with substantial changes in their mechanical and tribological properties. The objective of this manuscript is testing cytotoxicity and cytocompatibility *in vitro* in cell cultures of human osteoblasts using DLC films containing TiO₂ nanoparticles aiming this new composite applicability in bone-regenerative medicine. The films were deposited using plasma enhanced chemical vapor deposition technique. The cytotoxicity assay showed that all groups (DLC and TiO₂-DLC) had regulate cell growth similar to the negative control group. The activity of alkaline phosphatase of the studied sample groups reveals that the DLC and TiO₂-DLC coatings had similar behavior to the same processing means. Thus, it is concluded that the TiO₂-DLC films have great potential and viability for future biomedical applications.

Keywords: cytotoxicity, cytocompatibility, DLC, TiO₂-DLC and human osteoblasts

Introdução

Biomateriais são definidos como materiais artificiais criados para uso em áreas de saúde com o propósito de suplantarem a matéria viva cujo encargo foi perdido. Inclui qualquer substância sintética ou natural que pode ser usada como tratamento para substituição total ou parcial do tecido, órgão ou organismo [1]. Um dos mais citados em estudos tem sido os filmes de carbono tipo-diamante (DLC), que apresentam-se em formas hidrogenadas ou não hidrogenadas, são materiais amorfos, metaestáveis e caracterizados por atraentes propriedades mecânicas ópticas e elétricas além das notáveis propriedades químicas e tribológicas [2]. Existem muitas vantagens pelos revestimentos de DLC por apresentarem excelentes propriedades em diversos estudos biotribológicos *in vitro*. Mas suas particularidades ainda são barreiras quando se pensa em implantação de componentes protéticos revestidos com DLC *in vivo*. Daí a proposta em incorporar à matriz carbonada elementos metálicos como tungstênio, silício, titânio,

cobre, ouro, prata (W, Si, Ti, Cu, Au e Ag) ou elementos leves como silício, ferro, oxigênio, nitrogênio (Si, F, O e N) ou a adição de hidrogênio (H) [3]. Dentre eles, o titânio (Ti) e suas ligas são materiais que têm potencial por apresentarem ampla aplicação, principalmente pelas suas propriedades como alta resistência à corrosão, baixo módulo de elasticidade, conformabilidade, usinabilidade e biocompatibilidade [4]. A biocompatibilidade do Ti está relacionada com as propriedades da camada de óxido superficial, que tem de 2 a 10 nm (nanômetros) de espessura. Muitos procedimentos têm sido feitos para modificar a estrutura química da superfície do titânio através de recobrimentos, como recobrimentos com filmes de óxido de titânio [5]. Sabemos que os componentes dos biomateriais afetam as respostas biológicas porque promovem abalos na proliferação das células e no remodelamento tecidual [6], e neste aspecto, o grande desafio dos pesquisadores está sendo manipular as propriedades das superfícies desses materiais para conseguir respostas biológicas específicas e melhor controle da interface biomaterial-tecido [6]. Por isso que o grande desafio é alcançar um ajuste harmônico entre propriedades físicas e tecido substituído apresentando menor reação tóxica possível ao corpo humano [7].

Diante desta questão, este trabalho tem o objetivo de pesquisar a viabilidade celular dos filmes de carbono-tipo diamante (DLC) contendo nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) incorporadas para futuras aplicações biomédicas.

Materiais e métodos

1. Preparação das amostras

Os substratos (discos com espessura de 1 mm e diâmetro de 11 mm) utilizados para a realização dos experimentos neste trabalho foram amostras de aço inoxidável 304. Esses substratos foram submetidos a alguns processos de limpeza, responsáveis pela total remoção de impurezas que possam vir a comprometer a aderência dos filmes de DLC à sua superfície. Inicialmente, os substratos metálicos de aço inox foram limpos, em banho de acetona PA, sonificados por 5 minutos, e secos utilizando um jato de nitrogênio super seco.

2. Deposição dos filmes

A deposição dos filmes finos de DLC foi realizada pela técnica de deposição química da fase vapor assistida por plasma (*plasma enhanced chemical vapor deposition*, PECVD). A sequência de gases injetados no interior da câmara pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de gases injetados no processo de deposição dos filmes finos de DLC.

Elemento	Fluxo (sccm)	Pressão (mTorr)	Tensão (V)	Tempo (min)
Argônio	1	8,0	-700	20
Silano	1	8,0	-700	20
Metano	1	8,0	-400	20
Hexano	-	7,5	-700	180

Para a produção dos filmes de DLC contendo nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-DLC) incorporadas, nanopartículas de TiO₂ (Aeroxide® P25, Evonik) com cerca de 21 nm de diâmetro foram dispersas em hexano em diferentes concentrações (0,1; 0,3 e 0,5 g/L). Essas dispersões substituíram o hexano na produção dos filmes de TiO₂-DLC em diferentes concentrações.

3. Cultura celular

Todos os experimentos foram conduzidos sob aprovação do Conselho de Ética Institucional (#46420) da Unesp e foram repetidos de forma independente por 3 vezes, a fim de assegurar a reprodutibilidade. Osteoblastos humanos normais foram obtidas a partir de Lonza (CC-2538, Lonza, Walkersville, EUA) e cultivadas em meios de crescimento específico (OGM, CC-3207, Lonza).

4. Ensaio de citotoxicidade

As células foram semeadas em placas de 24 poços (10⁴ células/poço). Os grupos de controle foram estabelecidos como segue: um controle negativo (apenas meio de cultura de células, sem células) e um controle positivo (cultura de células em meio de cultura normal) e os 5 grupos de amostras: Aço, DLC e TiO₂-DLC em 3 concentrações: 0,1; 0,3 e 0,5 g/L. As amostras foram colocadas diretamente no meio, sem contato com as células, de tal forma que os seus produtos de degradação foram capazes de induzir citotoxicidade. Após 5 dias, as amostras foram removidas, as células foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco, Carlsbad, EUA) com 10% de ácido tricloroacético por 1 hora a 4°C. Após lavagem e secagem, as células foram coradas com uma solução sulforrodamina B 0,4% e de ácido acético 1% (SRB, Sigma, St. Louis, EUA) durante 30 minutos à temperatura ambiente e após serem coradas, as células foram lavadas novamente com ácido acético 1% para remover o corante não acoplado. O corante ligado foi solubilizado em 1mmol/L de base Tris (Sigma) e a solução resultante foi transferida para uma placa de 96 poços, de modo a ser lido por um leitor de placas de 570 nm. Os dados foram normalizados a partir das amostras do grupo de controle positivo.

5. Ensaio da fosfatase alcalina

A mineralização funcional foi observada por fosfatase alcalina (ALP). Esta atividade foi avaliada utilizando fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) como o substrato colorimétrico (#83369, Abcam, Cambridge,

Reino Unido). A eficácia do ensaio foi avaliada por ensaios realizados em meios regularmente suplementados por dexametasona e beta-glicerophosphate (CC-4194, Lonza) que são agentes indutores de mineralização. Após a incubação durante cinco dias, o sobrenadante foi recolhido em alíquotas de 50 μ L em triplicata e adicionado numa placa de 96 poços. O substrato foi adicionado a cada poço e os padrões foram preparados para ser lido num leitor de microplacas a 405 nm. Os dados foram apresentados como nmol de atividade por poço de acordo com os valores obtidos a partir de uma curva padrão. Os controles negativos foram utilizados para a placa em branco. As células foram semeadas em placas de 24 poços (10^4 células/poço). Os grupos amostrais e os procedimentos utilizados no preparo das amostras foram os mesmos estabelecidos para o ensaio de citotoxicidade.

Resultados

O resultado do ensaio de citotoxicidade indica que todos os grupos contendo DLC e TiO_2 -DLC tiveram crescimento regular das células de modo semelhante ao grupo de controle negativo, que não tinham nenhum espécime inicialmente, e o comportamento celular como pode ser visto na Figura 1.

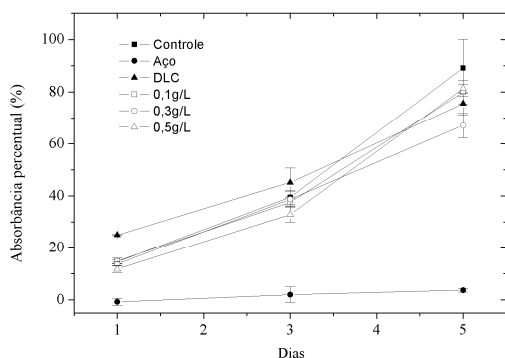


Figura 1: Curvas de absorbância em função do tempo.

Quanto ao grupo do aço, é possível afirmar que não houve crescimento celular significativo em relação aos outros grupos amostrais e que os valores de absorbância obtidos no aço podem ser atribuídos às células que aderiram na parte inferior da placa, assim como é possível concluir que todos os outros grupos apresentam a mesma evolução no desenvolvimento celular ao longo do tempo que é evidenciada pela similaridade dos resultados absolutos obtidos levando em consideração os desvios amostrais.

A análise de fosfatase alcalina mostra que não houve atividade mensurável nos grupos amostrais dos controles e do aço e foi detectada uma elevada atividade celular induzida pelo meio osteogênico, conforme é mostrado na Figura 2.

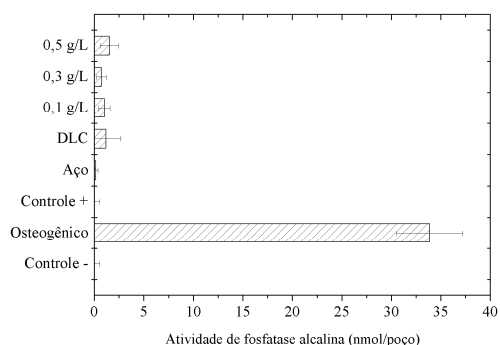


Figura 2: Atividade de fosfatase alcalina dos grupos amostrais estudados.

Discussão

Amostras de aço, DLC, TiO_2 -DLC em 3 concentrações diferentes e os controles foram levadas para o ensaio de citotoxicidade para avaliar a resposta celular dos osteoblastos humanos cultivados.

Os resultados demonstraram que o crescimento celular foi regular e positivo, com exceção do grupo aço. No estudo com aço puro e aço, usando como agente espumante o carbonato de amônio e o bicarbonato de amônio, o ensaio de MTT (teste de citotoxicidade baseado na redução do sal brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5 difeniltetrazolio), mostrou que todas as amostras não foram tóxicas para a cultura de fibroblastos [8].

Já em outra avaliação usando-se liga de aço inoxidável com baixa concentração de níquel com fibroblastos L-929, em 4 períodos diferentes (24, 48, 72 e 168 h), os resultados demonstraram que as amostras avaliadas não apresentaram citotoxicidade [9].

Já no estudo de biomateriais metálicos usando-se células de linhagem granulocíticas- macrofágica de camundongos, os resultados dos ensaios da citotoxicidade mostraram que o aço carbono AISI 1045 não apresenta características de biocompatibilidade, mostrou-se citotóxico para as células [10]. Na avaliação da citotoxicidade usando-se células de fibroblastos V79 verificou-se que nanotubos de titânio foram menos tóxicos quando comparados com o Titanato de Sódio, mostrando assim que os nanotubos de titânio são menos citotóxicos do que os de carbono [11].

E ao verificar a atividade de fosfatase alcalina (ALP) dos grupos amostrais estudados, os resultados revelam que as amostras de revestimentos de DLC e TiO_2 -DLC tiveram comportamentos semelhantes nos mesmos meios de tratamento.

Assim como na pesquisa onde se investigou íons de argônio sobre a superfície de Ti e sua influência na interação célula-superfície e encontrou-se que a expressão da atividade de ALP com células de pré-osteoblastos sobre discos de Ti em 3, 7, 11 e 14 dias não mostrou diferença significativa na atividade da enzima em questão nas superfícies do Ti, mas após os 14 dias a produção de ALP teve uma diferença maior sobre as

superfícies de Ti quando comparadas ao plástico da placa de cultura [12].

O uso do aço inoxidável como biomaterial de primeira escolha se faz marcante principalmente em cirurgias ortopédicas como grande opção no tratamento de fraturas. Pois sua biocompatibilidade foi comprovada por décadas de implantação humana com sucesso, por isso é considerado o material mais usado para fixação interna. Além de apresentar uma boa combinação de resistência mecânica, ductilidade, custo efetivo e facilidade de fabricação [13].

Vale ressaltar que foi observado num estudo que a interação dos macrófagos com o revestimento de DLC não induziu reações inflamatórias celulares. Estudos sobre o efeito dos revestimentos de DLC em células derivadas de tecidos que rodeiam a substituição total das articulações (macrófagos, fibroblastos e osteoblastos) não mostraram evidência de que são causadores da citotoxicidade, mesmo que em pequenas proporções [14]. Pesquisar a viabilidade celular dos filmes de carbonotipo diamante (DLC) contendo nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) incorporadas para futuras aplicações biomédicas reforça a preocupação com a mistura de titânio e aço inoxidável que é a corrosão galvânica, um processo onde os materiais de potencial eletroquímico diferentes são colocados em estreita proximidade em um ambiente eletrolítico, o que pode levar a complicações sérias, como infecções e afrouxamento asséptico do implante [15,16].

Conclusão

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que os filmes de DLC- TiO_2 apresentam grande potencial e viabilidade para futuras aplicações biomédicas devido ao comportamento de atividade celular observado nos espécimes estudados.

Agradecimentos

Os autores desse trabalho agradecem a CAPES e a FAPESP (2011/20345-7, 2011/17877-7 e 2012/21755-7) pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] Brown TL, Lemay HE, Bursten BE, Burdge JR. Química, A ciência central. 9ª ed. 2005. capítulo 12.
- [2] Grill A, Diamond and Related Materials; 1999. p. 428-434.
- [3] Escudeiro AIC. Estudo do comportamento tribológico em ambientes biológicos de revestimentos DLC dopados com Ti [dissertação]. Coimbra: Universidade de Coimbra; 2010.
- [4] Liu X, Chu PK, Ding C, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Materials Science and Engineering. 2004; (47): 49-121.
- [5] Schreckenbach JP, Marx G, Schlottig F, et al.

Characterization of anodic spark-converted titanium surfaces for biomedical applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 1999; (10): 453-457.

[6] Ziupos P. Recent development in the study of failure solid biomaterials and bone: 'fracture' and 'pre-fracture' toughness. Material Science and Engineering. 1998; (6): 33-40.

[7] Oréfice R. Cultura Médica. 2006.

[8] Mariotto SFF. Fabricação e caracterização microestrutural de sólidos celulares de aço inoxidável 316L austenítico por meio do processo de metalurgia do pó para aplicações biomédicas [dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2009.

[9] Pithon MM. et al. Avaliação da citotoxicidade de liga de aço inoxidável com baixa concentração de níquel. Ortodontia. 2009; 42(4):287-292.

[10] Pinedo FJ, Trindade c b, Pinedo CE. Estudo da citotoxicidade de biomateriais metálicos em cultura primária de células precursoras hematopoiéticas. In: Anais da 57ª reunião anual da SBPC; 2005 jul; Foz de Iguaçu, CE. 2005.

[11] Silva IRF, Moraes SG, Ferreira OP, Alves OL, Dúran N, Melo PS. Avaliação da citotoxicidade de nanotubos de titânio em fibroblastos. In: XIV Congresso Interno de Iniciação Científica - Unicamp; 2006 set; Campinas, São Paulo. 2006.

[12] Moura CEB. O bombardeamento da superfície de titânio com íons de argônio influencia a resposta biológica de pré-osteoblastos [tese]. São Paulo: USP; 2007.

[13] Disegi JA, Eschbach, L. Stainless steel in bone surgery. Revista Injury-international journal of the care of the injured. 2000; (31): D2-6.

[14] Cui FZ, Li DJ. A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films. Surf. Coat. Technol, 2000; 131 (1-3): 481 - 487.

[15] Clark CE, Shufflebarger HL Late-developing infection in instrumented idiopathic scoliosis. Spine (Phila Pa 1976) 1999; 24(18): 1909-12.

[16] Jacobs JJ, Gilbert JL, Urban RM Corrosion of metal orthopaedic implants. J Bone Joint Surg Am. 1998; 80(2): 268-82.