

Influência da composição dos gases durante a modificação da superfície por plasma na adesão de células primárias da polpa dental

Influence of the composition of gases during plasma surface modification on adhesion of primary cells from dental pulp

Keylla Dayanne Coelho
Clodomiro Alves Junior

Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Hugo Alexandre de Oliveira Rocha
Moacir Francisco de Queiroz Neto

Departamento de Bioquímica da UFRN

Jussier Oliveira Vitoriano

Departamento de Engenharia Mecânica da UFRN

José Sandro Pereira Da Silva

Departamento de Odontologia da UFRN

RESUMO

Amostras de titânio foram nitretadas por plasma usando duas composições gasosas: 80% H_2 -20% N_2 e 20% H_2 -80% N_2 , e as propriedades físicas químicas desse tratamento foram estudadas, bem como sua resposta biológica quando submetidas à cultura de células primárias da polpa dentária. Análise por difração de raios X indicam a formação de TiN nas duas amostras nitretadas ao contrário da superfície não nitretada que continha apenas a fase Ti- α . Verificaram-se modificações na dureza, topografia e molhabilidade dessas amostras quando comparadas às amostras não nitretadas. A adesão celular nessas amostras indica que o tratamento aumenta seu valor sendo superior para amostras tratadas em maior concentração de hidrogênio.

Palavras-chave: titânio; nitretação a plasma; descarga por gaiola catódica; células dentárias primárias.

ABSTRACT

Samples of titanium were nitrided using plasma and a composition of two gases: 80% H_2 -20% N_2 and 20% H_2 -80% N_2 . The influence of these treatments on their physical chemical properties and biological response when subjected to the primary cell culture of dental pulp were studied. Analyses by X-ray diffraction indicate the formation of TiN in both nitrided samples in contrast to the non-nitrided surface samples that contained only the Ti- α phase. Changes in hardness, topography and wettability of these samples compared to non-nitrided samples were found as well. Finally, the analysis of cell's adhesion in these samples indicate that treatment increases its value being higher for samples treated at higher hydrogen concentration.

Keywords: titanium; plasma nitriding; by cathodic cage discharge; primary dental cells.

Agradecimentos

- Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (Biopol).
- Instituto de Pesos e Medidas (IPEN) do Estado de Pernambuco.
- Núcleo de Estudos em Petróleo e Gás Natural (NEPGN)/UFRN.
- Fapern - Fundação de Apoio à pesquisa do Rio Grande do Norte.
- Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Introdução

O avanço científico no campo biomédico tem permitido a recuperação de tecidos humanos perdidos em função de processos patológicos ou traumas (1). Em determinados casos, a recuperação estética e funcional da estrutura anatômica prescinde de processos cirúrgicos para alocação de implantes ortopédicos e/ou dentários (1). A ciência dos materiais tem atuado na busca de um material implantável biocompatível com os fluidos biológicos que permita a reabilitação do indivíduo (2, 3). O titânio comercialmente puro (Ticp) e suas ligas têm se mostrado os materiais de escolha por suas características mecânicas, químicas e por formarem em contato com o ar uma fina camada de óxido de titânio (TiO_2), biocompatível com os tecidos humanos e que diminui o fenômeno de corrosão do material, além de influenciar na adesão celular à superfície do implante (3), que é imprescindível para a osseointegração dos implantes.

Os tratamentos superficiais procuram aperfeiçoar as características do titânio com as propriedades superficiais desejadas para a interface com fenômenos biológicos (2, 4). Dentre os processos de tratamento de superfície, a técnica de nitretação por plasma em gaiola catódica permite realizar simultaneamente a difusão do nitrogênio e deposição de filmes finos e uniformes (5) em diferentes substratos através do efeito em cátodo oco (2).

Dentre os parâmetros de nitretação, a composição gasosa é um dos mais importantes no controle das propriedades da superfície modificada. O objetivo desse trabalho é avaliar a influência da composição gasosa do processo de nitretação sobre a adesão de células da polpa dentária.

Metodologia

Preparo das Amostras

Discos de titânio comercialmente puro tipo II (Ticp II) de 19 mm x 1,5 mm (diâmetro X espessura) foram preparados metalograficamente até um polimento final em solução coloidal de sílica e peróxido de hidrogênio. Em seguida, foram limpos em banho ultrassônico por 10 minutos com solução de detergente enzimático diluído a 5% e enxaguados em água destilada. As amostras foram nitretadas num equipamento de plasma já descrito em trabalhos anteriores (6), usando a configuração de gaiola catódica. Em torno dos discos foi colocada uma gaiola catódica de titânio puro tipo II com dimensões de 76 mm de diâmetro por 34 mm de altura (figura 1), sendo a espessura da parede de 0,8 mm, com furos de 12 mm de diâmetro e distância entre os centros dos furos adjacentes de 13,2 mm. A tampa de Ticp II sobreposta a gaiola continha um total de 12 furos dispostos de forma homogênea em sua superfície.

O grupo das amostras não nitretadas foi usado como controle e denominado de grupo Ticp II-1. Os dois outros grupos usados no presente trabalho foram nitretados conforme condições apresentadas na tabela I.

Tabela I. Composição gasosa e respectivos fluxos utilizados durante a nitretação realizada na voltagem de 831 V, corrente de 0,38 A, pressão 0,8 mbar e temperatura de 450°C

	Composição da atmosfera	Fluxo
Ticp II - 1	-	-
Ticp II -2	20% H_2 +80% N_2	3 sccm H_2 -12sccm N_2
Ticp II -3	80% H_2 +20% N_2	12 sccm H_2 -3sccm N_2

Antes da nitretação, foi realizado um procedimento de limpeza das superfícies das amostras. Para tanto, vácuo até pressão de 8×10^{-3} mbar foi realizado para introdução de 12 sccm de H_2 como gás redutor dos óxidos presentes. Quando a pressão atingiu 0,2 mbar foram estabilizados os demais parâmetros em 0.10 mA, e 914V e 200°C por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram nitretadas conforme as condições da tabela I.

Para as amostras do grupo Ticp II-3 (80% H_2 - 20% N_2), o nitrogênio foi introduzido até atingir um fluxo total de H_2+N_2 de 15sccm. Para as amostras do grupo Ticp II-2 (20% H_2 -80% N_2), o fluxo de H_2 foi reduzido até 3sccm e introduzido nitrogênio até atingir o fluxo total de 15sccm. A temperatura foi monitorada por um termopar cromo-alumínio em contato com o porta-amostra e controlada pelo ajuste da tensão e da corrente entre eletrodos. Nestas condições de pressão e temperatura constantes, as amostras foram nitretadas por 60 minutos obedecendo a um fluxo total de 15sccm. Após a nitretação, todas as amostras eram esterilizadas por raio gama com 25KGy lançados em doses médias de 8,9KGy/h.

Caracterização Físico-Química

Três amostras de cada grupo Ticp II foram caracterizadas quanto à topografia, molhabilidade e fases cristalinas. Microscopia de força atômica foi utilizada para análise do perfil e determinação da rugosidade. Determinação do ângulo de contato estático foi realizada num goniômetro desenvolvido no Laboratório de Processamento de Materiais por Plasma da UFRN e já descrito em trabalhos anteriores (7). Gotas de água e glicerol foram utilizadas para obtenção dos componentes polares e dispersivos, respectivamente, e determinação da tensão superficial. A análise do filme de TiN foi realizada pelo difratômetro de raios-X com incidência rasante (5 graus) usando tubo de cobre (radiação Cu K-alfa) e ângulos de varredura entre 30 e 80°. A identificação das fases foi realizada em um programa Match 2.

Delineamento da Adesão Celular

Terceiros molares superiores, que seriam desprezados após a cirurgia de um paciente de 32 anos, do sexo masculino, foram utilizados para obtenção das células mesenquimais da polpa coronária. O paciente foi conscientizado da importância da pesquisa e sua aquiescência foi estabelecida pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), anteriormente aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) por estar em conformidade com os critérios operacionais da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

O acesso à câmara pulpar, para remoção do grupo celular utilizado nesse experimento, ocorreu por odontosecção completa da coroa e raiz, seguida da remoção da polpa coronária por instrumental de Lucas. O tecido pulpar foi submetido à digestão enzimática com 6mg/mL de colagenase I (Gibco, USA) e 8mg/mL de dispase (Gibco, USA), diluídos em 2 ml de PBS. A suspensão foi centrifugada em 1200 rpm durante oito minutos e o sobrenadante retirado, permitindo que as células precipitadas fossem suspensas e cultivadas em garrafas pequenas contendo meio básico α -MEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 15% de soro fetal bovino, FBS (Cultilab, Brasil). A cultura celular foi mantida a 37°C em 5% de CO_2 até atingirem 70-90% de confluência, com troca de meio a cada três dias. No subcultivo, o meio básico foi removido e então adicionado às placas 2 mL de Tripsina/EDTA (0,25% de Tripsina contendo 1 mM de EDTA - Cultilab, Brasil). A suspensão celular foi colocada em tubo cônico com o mesmo volume de meio α -MEM suplementado com 15% de FBS com o objetivo de inativar a tripsina e centrifugadas, sendo o sobrenadante removido e as células ressuspensas em meio α -MEM. Uma alíquota da suspensão na terceira passagem foi separada para a contagem na Câmara de Neubauer e determinação da viabilidade celular.

Células da polpa coronária retiradas de garrafas da quarta passagem foram plaqueadas em triplicata respeitando-se a contagem de 6×10^3 células/poços em placa de 96 poços para um acompanhamento por sete dias do desenvolvimento celular. A análise foi realizada pelo teste quantitativo da redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) 98% Aldrick, na concentração de 1mg/ml de meio alfa-mem sem SFB (soro fetal bovino) que resulta na produção de cristais de formazano no interior das células. Após 4h, as células foram lisadas por etanol PA e a absorbância da liberação dos cristais foi medida em um equipamento Elisa Biotek. Para análise da adesão celular a densidade de 6×10^3 células/poço foi plaqueada em triplicata para os ensaios de adesão nos grupos Ticp II-1, Ticp II-2 e Ticp II-3. A adesão celular foi mensurada após 24h do plaqueamento pelo método de coloração por Cristal Violeta a 0,2% em 2% de etanol. Após 5 minutos de contato com a solução, os discos foram lavados com PBS para remoção do excesso de reagente e imersos em uma solução de lise composta por etanol 50% e 0,1M de citrato de sódio, que promoveu a lise e subsequente liberação do reagente absorvido pelas células.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise por T-Student entre duas amostras, presumindo variâncias diferentes entre as amostras, quando valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A correlação entre os dados foi estabelecida pela análise de Pearson (r de Pearson) em que produtos $r = 1$ demonstraram uma correlação diretamente proporcional, produtos $r = -1$ demonstraram uma correlação inversamente proporcional e $r = 0$ demonstrou que uma variável não depende linearmente da outra.

Resultados e Discussão

O tratamento de nitretação por plasma em gaiola catódica permite tanto a difusão de nitrogênio para o interior da amostra como também a formação de filmes de TiN (nitretação). A presença do hidrogênio na atmosfera nitretante tem a função de reduzir as impurezas de oxigênio residual, modificar a topografia da superfície por erosão química e auxiliar na difusão do nitrogênio no titânio (7). A inserção de íons de nitrogênio na superfície permite a formação de um filme de nitreto de titânio (TiN)(8) com alto potencial anticorrosivo e biocompatível (8-11). Além disso, o bombardeamento dos elétrons contra os átomos e moléculas dos gases geram novos íons e elétrons que são acelerados contra o cátodo e produzem diversas reações na superfície do substrato (12), alterando a tensão superficial, molhabilidade e rugosidade do Ti que são fenômenos comumente associado à adesão celular em biomateriais.

Na análise do difratograma de raios X apresentado na figura 2, observa-se que o pico referente ao $Ti\alpha$ foi reduzido quando as amostras foram nitretadas. Para essas amostras também se observa o surgimento dos picos referentes ao TiN. Aliando esses dois fatos pode-se concluir que o TiN está em forma de filme sobre a superfície do $Ti\alpha$. Por outro lado também se verifica que para amostras tratadas com maior concentração de H_2 houve maior intensidade do pico de TiN, indicando que o hidrogênio possui função importante no mecanismo de nitretação.

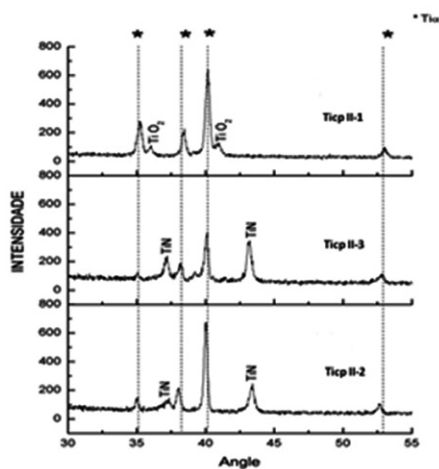


Figura 1. Gráfico de difração de raios X

A topografia da superfície é extensivamente associada à resposta celular *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, há divergência com respeito ao tipo de topografia preferida para a adesão celular. No presente trabalho três topografias diferentes foram analisadas. Na tabela II, são apresentados os valores médios e respectivos desvios padrões referentes aos parâmetros de rugosidade R_a , R_p , R_z , e R_p/R_z . Os valores de R_a são comumente utilizados por indicarem os valores médios de variação dos picos e vales em relação à linha média imaginária do perfil da superfície. Esses valores nos dão uma análise parcial da topografia e sua complementação pode ser obtida dividindo-se o valor de R_p , valor da análise dos picos, por R_z , valor médio da rugosidade unitária obtida em cinco comprimentos de medição. O produto dessa equação nos permite avaliar as topografadas superfícies, sendo que maiores valores da relação do contorno indicam a presença de picos com vértices mais afilados (13).

Tabela II. Análise da rugosidade da superfície de titânio puro e nitretado a plasma por Microscopia de Força Atômica

	Ticp II -1*	Ticp II-2*	Ticp II-3*
R_a	1,61	9,20	10,07
R_z	51,16	161,06	117,84
R_p	2,46	12,07	12,67
R_p/R_z	0,67	0,61	0,49

*média aritmética dos valores de rugosidade

Pelos valores da Tabela II verifica-se que as amostras nitretadas possuem valores de R_a superiores à amostra sem tratamento. Apesar da maior rugosidade dessas amostras, aquela nitretada com maior concentração de nitrogênio apresentou R_p/R_z próxima da amostra sem tratamento, ou seja, iguais a 0,61 e 0,67, respectivamente. A amostra Ticp II-3 apresentou um valor de 0,49, o que demonstra maior arredondamento dos picos.

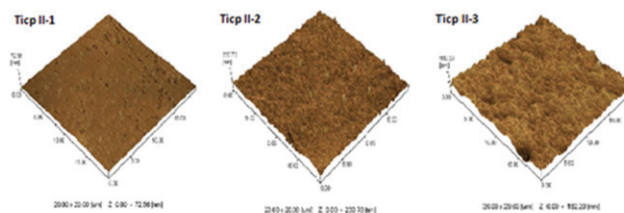


Figura 2. Análise topográfica da superfície de titânio nitretado a plasma. Ticp II-1 controle; Ticp II-2 80% N_2 20% H_2 ; Ticp II-3 20% N_2 80% H_2

A hidrofiliabilidade do material é correlacionada à adsorção de proteínas na superfície e, por consequência, a adesão celular (3). A deposição do líquido na superfície de um sólido resulta na formação de uma gota (Figura 3) e o mensuramento da interseção da linha tangente ao líquido e a superfície do sólido dá origem ao ângulo de contato que é característico da tensão superficial do líquido e energia superficial do substrato (14)

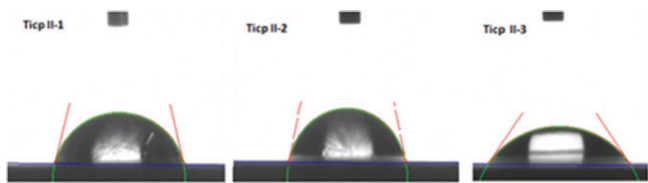


Figura 3. Perfil do ângulo de contato nos ensaios de molhabilidade das amostras de titânio puro e nitretado a plasma Ticp II-1 controle; Ticp II-2 80%N₂,20%H₂; Ticp II-3 20%N₂,80%H₂

As superfícies de Ticp II-1, Ticp II-2 e Ticp II-3 apresentaram ângulos de contato que foram avaliados de forma estática pelo método da gota séssil e seus resultados médios estão demonstrados na tabela III. A tensão superficial das amostras demonstrou sensibilidade ao processo de nitretação em ambos os fluxos quando comparados com o controle, sendo $\gamma_{s/1} = 29,51$, $\gamma_{s/2} = 45,62$ e $\gamma_{s/3} = 50,61$. As superfícies Ticp II-2 tiveram o componente polar diminuído e o apolar aumentado, 11,81 e 33,80, respectivamente, quando comparados com a superfície Ticp II-3 que obteve os valores médios de 35,39 para os componentes polares e 15,22 para os componentes apolares.

Tabela III. Análise da hidrofília da superfície de titânio puro e nitretado a plasma por ensaios de molhabilidade

	Ticp II-1*	Ticp II-2*	Ticp II-3*
Água	76,74	76,19	52,35
Desvio	0,78	0,61	0,86
Glicerol	79,89	60,51	49,78
Desvio	0,66	0,77	0,85
γ_{sp}	25,69	11,81	35,39
γ_{sd}	3,82	33,80	15,22
γ_s	29,51	45,62	50,61

*média aritmética dos valores do ângulo de contato. γ_s = tensão superficial; γ_{sp} = componente polar; γ_{sd} = componente apolar

A influência da rugosidade na hidrofília da superfície é extensamente pesquisada e não há consenso quanto à interferência desse fenômeno nos ângulos de molhabilidade, sendo que alguns autores sugerem, inclusive, uma adequação do ângulo de Young pela inserção de um fator de correção referente à rugosidade com base na termodinâmica dos ângulos de contato em superfícies ásperas e heterogêneas (8). O que observamos nesse ensaio é que embora tenha ocorrido uma mudança significativa entre os valores de Ra do Ticp II-1 e Ticp II-2, não houve uma diferença significativa entre os ângulos de contatos da superfície com $p = 0,94$, enquanto os valores de Ra entre Ticp II-2 e Ticp II-3 apresentaram $p > 0,05$, mas apresentaram ângulos de contato com diferença significativa ($p = 0,03$).

A fase inicial e imediata da adesão celular decorre da adsorção de água na superfície do material, seguida pela deposição de proteínas intrínsecas da matriz extracelular, sendo a qualidade desse fenômeno relacionado à fase de fi-

xação, morfologia, proliferação e diferenciação celular (1). A aderência celular na superfície do titânio ocorre em função das características topográficas e químicas desse biomaterial (15) que foram alterados pelo tratamento a plasma em gaiola catódica com fluxo de 20%N₂80%H₂ e 80%N₂80%H₂ (Tabelas I e I). A adesão na superfície de Ticp II-3 (0,21) foi superior às superfícies Ticp II-1 (0,19) e Ticp II-2 (0,20), mostrado na figura 4, entretanto, a análise por t-student demonstra que o valor de p é similar entre as superfícies e não significativo ($p > 0,05$).

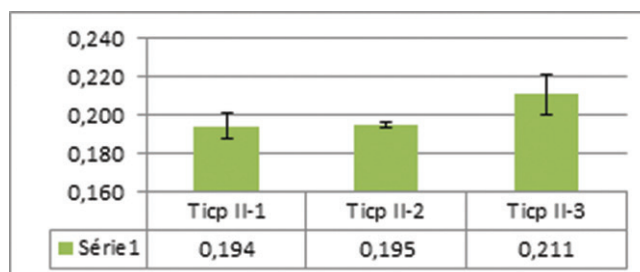


Figura 4. Adesão celular na superfície de titânio puro e nitretado a plasma após 24h do plaqueamento celular. A sobreposição da barra de erros indica o desvio padrão dos resultados de 0,006 Ticp II-1; 0,001 Ticp II-2; 0,01 Ticp II-3

A maioria das células se comporta como macroânions que são corpos carregados eletronegativamente e hidrofílicos (16), fenômeno que pode explicar a maior adesão das células mesenquimais da polpa dentária a superfície de Ticp II-3 que apresentou um componente polar superior as superfícies de Ticp II-2.

Conclusão

- Amostras nitretadas em atmosferas mais ricas em hidrogênio produziram superfície com Ra superior. Pela análise topográfica e da razão Rp\Rz verificou-se que elas possuem picos mais arredondados.
- Amostras nitretadas em atmosferas ricas em hidrogênio apresentam maior componente polar e menor componente dispersivo de tensão superficial.
- Maior adesão celular foi observada nas amostras tratadas em atmosferas mais ricas em hidrogênio.
- Diante dos resultados pode-se concluir que a introdução de hidrogênio na atmosfera nitretante contribui para maior adesão celular.

Referências ::

1. ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000; 21 (7): 667-81.
2. ALVES JR., C., GUERRA NETO, C. L. B., MORAIS, G. H. S. *et al.* Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge. *Surface and Coatings Technology*. 2005; 194 (2-3): 196-202.
3. TAVARES, J. C. M., CORNÉLIO, D. A., DA SILVA, N. B. *et al.* Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro. *Toxicology*. 2009; 262 (2): 138-45.
4. ALVES JR., C., HAJEK, V., DOS SANTOS, C. A. Thermal behavior of supersolidus bronze powder compacts during heating by hollow cathode discharge. *Materials Science and Engineering*. 2003; 348 (1-2): 84-9.
5. MARANDA-NIEDBAŁA, A., NOWAKOWSKI, R. AFM of titanium nitride layers prepared under glow discharge conditions. *Journal of Alloys and Compounds*. 2006; 424 (1-2): 272-8.
6. SÁ, J. C., DE BRITO, R. A., MOURA, C. E. *et al.* Influence of argon-ion bombardment of titanium surfaces on the cell behavior. *Surface and Coatings Technology*. 2009; 203 (13): 1765-70.
7. BOUGDIRA, J., HENRION, G., FABY, M. Effects of hydrogen on iron nitriding in a pulsed plasma. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 1991; 1076-80.
8. LONG, J., HYDER, M. N., HUANG, R. Y. *et al.* Thermodynamic modeling of contact angles on rough, heterogeneous surfaces. *Adv Colloid Interface Sci*. 2005; 118 (1-3): 173-90. PubMed PMID: 16154106. Epub 2005/09/13. eng.
9. CHIANG, C. Y., CHIOU, S. H., YANG, W. E. *et al.* Formation of TiO₂ nano-network on titanium surface increases the human cell growth. *Dental Materials*. 2009; 25 (8): 1022-9.
10. HUANG, H. H., HSU, C. H., PAN, S. J. *et al.* Corrosion and cell adhesion behavior of TiN-coated and ion-nitrided titanium for dental applications. *Applied Surface Science*. 2005; 244 (1-4): 252-6.
11. HUANG, G. T. J., SHAGRAMANOVA, K., CHAN, S. W. Formation of Odontoblast-Like Cells from Cultured Human Dental Pulp Cells on Dentin In Vitro. *Journal of Endodontics*. 2006; 32 (11): 1066-73.
12. KAWAI, H., SHIBATA, Y., MIYAZAKI, T. Glow discharge plasma pretreatment enhances osteoclast differentiation and survival on titanium plates. *Biomaterials*. 2004; 25 (10): 1805-11.
13. MARTIN, J. Y., SCHWARTZ, Z., HUMMERT, T. W. *et al.* Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and J. Biomed Mater Res. 1995; 29 (3): 389-401. PubMed PMID: 7542245. Epub 1995/03/01. eng.
14. MEKAYARAJJANANONTH, T., WINKLER, S. Contact angle measurement on dental implant biomaterials. *J. Oral Implantol*. 1999; 25 (4): 230-6. PubMed PMID: 10823023. Epub 2000/05/24. eng.
15. DELIGIANNI, D. D., KATSALA, N., LADAS, S. *et al.* Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*. 2001; 22 (11): 1241-51.
16. VAN OSS, C. J. Hydrophobicity of biosurfaces — Origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1995; 5 (3-4): 91-110.

Research Highlights

- A formação de TiN é maior quando há maior presença fluxo de H₂ no processo de nitretação a plasma por gaiola catódica.
- A rugosidade média não interferiu nos ângulos de molhabilidade da superfície de titânio.
- A adesão celular mostrou-se sensível as alterações dos componentes polares da superfície de titânio nitretado a plasma.

Recebido em: 21/03/2014 / Aprovado em: 25/04/2014

Keylla Dayanne Coelho

Rua Tiradentes, 181 - apartamento C, Centro

Campina Grande/PB, Brasil - CEP: 58.100-000

E-mail: keylladayanne@hotmail.com