



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE SUPERFÍCIES
RECOBERTAS POR NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE
MÚLTIPLA (MWCNT)**

**RELATÓRIO FINAL DE PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
(PIBIC/CNPq/INPE)**

Mariana Bernardes da S. Palma (UNIVAP, Bolsista PIBIC/CNPq)

E-mail: mariana@las.inpe.br

Dr. Evaldo José Corat (LAS/CTE/INPE, Orientador)

E-mail: corat@las.inpe.br

Dra. Cristina Pacheco Soares (UNIVAP, Co-orientadora)

E-mail: cpsoares@univap.br

COLABORADORES

Mestrando Anderson de O. Lobo (ITA/INPE)

Dr. Érica Freire Antunes (ITA/INPE)

Julho – 2008

FOLHA DE APROVACAO

"O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar."

(Albert Einstein)

*Meus pais,
Mário J. R. Palma e
Ernestina B. da S. Palma*

AGRADECIMENTOS

Ao conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, pela oportunidade de estudo e utilização de suas instalações.

Ao Laboratório Associado de Sensores e Materiais – LAS, pela oportunidade de utilização de suas instalações.

Ao orientador Prof. Dr. Evaldo José Corat, pelo conhecimento passado, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

A Prof. Dr. Cristina Pacheco Soares, pelo conhecimento passado, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares - UNIVAP, pela oportunidade de utilização de suas instalações.

Aos amigos de laboratório Dra Erica Freire Antunes e Mestrando Anderson de Oliveira Lobo, pelo conhecimento passado, paciência e ajuda na realização deste trabalho.

Resumo

Os materiais nanoestruturados despertam interesse na área de bioengenharia para a produção de “arcabouços” (do inglês, “*scaffold*”), devido as suas similaridades com a matriz extracelular (MEC) presentes em todas as partes do corpo humano. Suas configurações, dimensões e propriedades físico-químicas influenciam nas interações celulares que conduzem à regeneração de tecidos, sendo vistos como um avanço em superfícies implantáveis. Dentro da classe de materiais nanoestruturados os Nanotubos de Carbono têm grande potencial para aplicações biomédicas, devido às suas propriedades únicas, tais como, alta condutividade elétrica, alta estabilidade química, alta resistência mecânica e facilidade de incorporação de grupos funcionais para a produção de “*scaffolds*”. Para que um novo material possa ser incorporado em aplicações biomédicas, torna-se necessário que sejam pesquisadas a toxicidade e a biocompatibilidade, onde são avaliados a habilidade e o desempenho do material em meios biológicos, sendo estes testes validados conforme normas técnicas de órgãos públicos. O objetivo deste trabalho foi à realização de testes preliminares de citotoxicidade direta “*in vitro*” de superfícies de titânio recobertas com nanotubos de carbono, avaliando possíveis aplicações dos nanotubos de carbono em revestimentos de superfícies implantáveis ou incorporação dos mesmos na produção de “*scaffolds*” para reconstituição de tecidos. Os filmes de nanotubos de carbono foram crescidos sobre superfícies de silício no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS/INPE). Os testes de citotoxicidade e preferência celular (MTT e LDH) foram realizados no Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Intracelulares da UNIVAP. Para a realização dos testes utilizou-se linhagens de fibroblastos (L-929 - tecido conjuntivo de camundongo) e osteoblastos humanos (HOB – Osteossarcoma). Como resultados parciais, “*in vitro*”, as superfícies recobertas com nanotubos de carbono mostraram-se como não-citotóxicas (teste MTT). Houve proliferações celulares sobre os MWCNT (testes preferência celular) e nas culturas de células em contato com os mesmos (teste LDH). Estas alterações positivas de proliferação e preferência celular podem ser descritas devido as similaridades das dimensões dos MWCNT a componentes naturais da MEC. Sendo desta forma considerados importantes para uma possível aplicação em bioengenharia.

ABSTRACT

The development of nanostructured biomaterials are very promising because they present good similarity with natural nanostructures components of the extracellular matrix (ECM) present in all body tissues. Their spatial organization, size, physical and chemical properties influences the cellular matrix interaction that stimuli the tissue regeneration, leading an improvement in implantable surfaces. In the classes of nanostructured materials the carbon nanotubes have great potential for biomedical applications due to their unique properties such as high electrical conductivity, high chemical stability, high mechanical strength and facilitation of the incorporation of functional groups for scaffolds production. For a new material being used in biomedical applications, it is necessary toxicity and biocompatibility assays, in which the ability and performance of the material in biological specimens were evaluated by technical standards development by governmental organs. The goal of this work was the evaluation of vertically aligned CNT films on titanium surfaces. Were used initial cytotoxicity and cytocompatibility assays, assessing possible applications of CNT for implantable surfaces or incorporation of them in the scaffolds production to tissue regeneration applications. The deposition of the metallic films (Fe and Ni) on the surfaces of the samples was carried out in the Associated Laboratory of Sensors and Materials (LAS/INPE) in a electron beam (Auto 306 - EB3 Multihearth Electron Beam Source), with thickness of 7nm. The biocompatibility tests had been carried out in the Laboratory of Dynamics Compartment Cells (UNIVAP). For the tests was used fibroblastes (L-929 - conjunctive of mouse) and osteoblasts cells (OFCOL-2 osteoblastes of mouse). The different behavior is most probably related to excess iron contamination present in the case of titanium substrate, while nickel catalyst is probably enclosed by the nanotubes.

SUMÁRIO

	PÁG.
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	16
CAPITULO 1: INTRODUÇÃO.....	18
2.1 Produção de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT).....	24
2.2 Linhagem celular.....	25
2.2.1 Fibroblastos.....	25
2.2.2 Osteoblastos.....	25
2.3 Manutenção da cultura celular.....	25
2.4 Teste de citotoxicidade.....	26
2.5 Testes colorimétricos.....	27
2.5.1 Testes de citotoxicidade pelo método direto (MTT e LDH).....	28
2.6 Testes de adesão celular.....	30
CAPITULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
3.1 Resultados dos testes de citotoxicidade com fibroblastos.....	31
3.1.1 Resultados dos testes de citocompatibilidade com fibroblastos.....	36
3.2 Resultados dos testes de citotoxicidade com osteoblastos.....	42
3.2.1 Resultados dos testes de citocompatibilidade com osteoblastos.....	43
CAPITULO 4: Conclusões.....	45
CAPITULO 5: Trabalhos Futuros.....	46
CAPITULO 6: Referências Bibliográficas.....	47
CAPITULO 7: Anexos	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Reator de microondas para o crescimento de nanotubos de carbono (MWCNT)..... 24
- Figura 2:** Nanopartículas formadas durante o processo de pré-tratamento, (A) amostras recobertas com filme de Fe e (B) amostras recobertas com filme de níquel..... 31
- Figura 3:** MWCNT alinhados obtidos utilizando ferro (A) e níquel (B) como catalisador..... 32
- Figura 4:** Estrutura interna do MWCNT, vista por Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM)..... 32
- Figura 5:** Análise da atividade mitocondrial (MTT) e LDH (LDH total) em células L929 em contato com MWCNT alinhados verticalmente, utilizando Fe e Ni como catalisadores, com tempos de incubação de 6, 24, 48, 72h. Os valores são expressos em densidade óptica de 570 nm (a) e 490 nm (b), respectivamente. O controle negativo é o filtro de papel. O controle positivo é o látex os resultados são a média \pm desvio padrão para n=5..... 34
- Figura 6:** Análise da proliferação celular (L929) medido pelo teste de LDH total na interação com os MWCNT. A porcentagem da proliferação celular foi calculada por normalização de densidade óptica para células em contato com Titânio. Os resultados são a média \pm desvio padrão para n=5. ($p < 0001$ a interação é considerada extremamente significativa e $p < 0.05$ a interação é considerada importante)..... 35
- Figure 7:** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da adesão celular em superfície de Titânio e MWCNT. Tempos de interação: 6h (A,B), 12h (C,D), 48h (E,F) e 7 dias (G,H)..... 37
- Figura 8:** Imagens de MEV mostrando a interação das células L929 com a superfície de Ti e do MWCNT, após de 6h de incubação..... 38
- Figura 9:** Imagens de MEV mostrando a interação das células de L929 com MWCNT utilizando Ni e Fe como catalisadores, após 48h de incubação..... 39
- Figura 10:** Imagens de MEV mostrando a interação das células de L929 com MWCNT utilizando Ni e Fe como catalisadores, após 7 dias de incubação..... 41
- Figura 11:** Viabilidade celular dos osteoblastos (HOB). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada por normalização de densidade óptica. Os resultados são a média \pm desvio padrão para n=5. ($p < 001$ a interação é consideravelmente importante)..... 43
- Figure 12:** Imagens de MEV mostrando a interação celular das células de osteoblasto com MWCNT. (1a, 2a) 6h de incubação, (1b, 2b) 24h de incubação (1c, 2c) 24h de incubação (1d, 2d) após 48h de incubação (3a) projeções de membrana em direção aos MWCNT. Aumento: (1a-1d) 500x; (2a-2d) 2000X; 3a) 33000X..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão dos grupos para os testes de citotoxicidade pelo método direto (MTT e LDH).....	28
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Atualmente, procura-se, através da bioengenharia, o desenvolvimento de biomateriais e revestimentos que sejam capazes de auxiliar no desenvolvimento, ou mesmo na substituição, de órgãos e sistemas biológicos para cada vez mais auxiliarem no tratamento e controle de disfunções. O desenvolvimento de materiais nanoestruturados é uma área promissora porque apresentam similaridade com os componentes nanoestruturados da matriz extracelular (MEC). Os Nanotubos de Carbono MWCNT se apresentam como um futuro na regeneração óssea. [1, 2, 3, 4, 5,6].

Os nanotubos de carbono (NTC) são estruturas semelhantes ao fulereno, que consistem de cilindros de grafeno fechados nas extremidades por anéis pentagonais. Em geral, existem dois tipos de nanotubos de carbono: Os nanotubos de carbono de parede simples (do inglês SWCNT) e os nanotubos de carbono de parede múltipla (do inglês MWCNT). E vêm surgindo como uma classe de nanomateriais com grande potencial para aplicações biomédicas, devido às suas propriedades únicas, tais como, alta condutividade elétrica, alta estabilidade química, e alta resistência mecânica [7]. Estas propriedades especiais são designadas aos nanotubos de carbono de paredes simples (SWNTs) e aos nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT).

Entretanto, para que um novo material possa ser incorporado em aplicações biomédicas exige-se uma avaliação completa de possíveis danos que possam vir a causar em organismos vivos. Desta forma, torna-se extremamente necessário que sejam realizadas pesquisas de toxicidade e a biocompatibilidade, onde será avaliado a habilidade e o desempenho do material em meios biológicos.

Segundo Willian (1981), biocompatibilidade pode ser definida como habilidade de um material de propiciar resposta biológica apropriada numa aplicação específica. Os testes de biocompatibilidade “*in vitro*” vão mimetizar as condições biológicas para testar materiais, simulando sua implantação nos tecidos do organismo ou sobre eles. Esses métodos visam promover a redução de custos na produção de novos materiais [8]. A realização de ensaios “*in vitro*” ainda permite redução no número de animais utilizados na avaliação da biocompatibilidade de um biomaterial [9].

O primeiro nível de teste, dentro da avaliação de biocompatibilidade [10] é a determinação da citotoxicidade “*in vitro*”. Em comparação com as investigações *in vivo*, os estudos “*in vitro*” são mais facilmente controlados e apresentam melhor reprodutibilidade [11,12]. O cultivo de células “*in vitro*” constitui-se de uma valiosa ferramenta para se conhecer os mecanismos pelos quais biomateriais podem produzir reações adversas em nível celular [13]. Assim, citólise e mudanças no crescimento e na permeabilidade da membrana celular podem ser verificadas “*in vitro*” [14]

Normalmente avalia-se citotoxicidade basal, isto é, aquela que afeta estruturas e funções comuns a todas as células do organismo, como membrana celular, mitocôndria, ribossomos, cromossomos e lisossomos. Alterações nas funções basais geralmente afetam as específicas [15]. Os estudos de citotoxicidade se baseiam, portanto, no estudo de parâmetros relacionados às funções celulares basais.

Existe um vasto número de testes “*in vitro*” sendo que cada um consiste basicamente de três componentes: o sistema biológico, o contato célula / material, o resultado a ser aferido “*endpoint*”. Normalmente, o sistema biológico utilizado é o de cultura de células, podendo ser utilizadas células de linhagem permanente ou de cultura primária [11].

Os tempos de exposição aos materiais testados podem ser de curta duração, envolvendo períodos de até 4 horas ou de longa duração, correspondendo a períodos de 24 horas ou mais [15]. A citotoxicidade aguda é verificada no período de 24 horas [16].

A avaliação de citotoxicidade pode ser feita através de ensaios qualitativos ou quantitativos. Os ensaios qualitativos consistem na avaliação da morfologia através de descrição ou atribuição de escores. Os quantitativos caracterizam-se pela quantificação do número de células e atividade celulares após a exposição ao agente sob teste [10].

Além da descrição da morfologia frente a um material potencialmente tóxico, com diferentes “*endpoints*” podem ainda ser utilizados como indicadores de dano celular, devido a exposição a algum agente tóxico, tais como: efeitos na membrana celular e na taxa de proliferação [11].

As alterações morfológicas podem ser analisadas, comparando-se as células expostas ao material-teste e células não exposta, pois devido à exposição ao agente tóxico

pode haver, ou não, morte celular alterando o número de células e a taxa de proliferação das mesmas [17,18].

Os estudos da interação célula-material são também de grande importância para avaliar adesão e proliferação das células sobre o material, o que está diretamente relacionado com a citocompatibilidade do mesmo [19].

A biocompatibilidade e a citotoxicidade dos MWCNT já vêm sendo amplamente avaliadas por diversos grupos de pesquisa, onde estão sendo realizados tanto estudos “*in vitro*” como “*in vivo*”. Esta é uma área de pesquisa extremamente recente em que, vários artigos têm sido publicados nos últimos meses.

Basicamente existem dois tipos de testes “*in vitro*” descritos na literatura: um com os MWCNT dispersos na cultura de células [20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,27], e outro com os MWCNT aderidos a alguma superfície e em contato com a cultura [28, 29, 30, 31,32]. Muitos estudos sugerem uma baixa biocompatibilidade dos MWCNT em cultura de células, porém outros mostram resultados contrários. Alguns estudos mostram que os MWCNT não são tóxicos às células, entre elas células de pulmão humano tipo epitelial [33], macrófagos humanos [34], e células de músculo cardíaco de rato [35]. Contudo, outros estudos mostram a preferência celular por superfícies cobertas com MWCNT para o seu crescimento [36, 25, 26, 27, 28]. Muitos estudos realçam a interferência do MWCNT e outros materiais baseados em carbono com corantes citotóxicos, comumente utilizados para avaliar a integridade, viabilidade e proliferação das células [37, 38, 39, 40, 41. 42, 43]. Além disso, fica a pergunta se a citotoxicidade deve-se ao MWCNT, ou aos contaminantes que podem estar presentes como partículas metálicas ou carbono amorfo, provenientes do processo. Claramente, alguns estudos que obtiveram bons resultados de viabilidade celular realizaram algum processo de purificação ou funcionalização dos MWCNT. Sendo que alguns autores sugerem que para se avaliar a viabilidade celular os MWCNT passem por algum processo de funcionalização [44]. Ao contrário, outros mostram que se os MWCNT passarem por algum processo de funcionalização a citotoxicidade aumenta [13]. Outros também mostram que sem nenhum tipo de purificação ou funcionalização os MWCNT podem apresentar resultados de alta viabilidade celular, e uma preferência celular pelo mesmo, devido à alta adesão celular sobre os filmes de MWCNT [25, 26]. Ainda é cedo para se estabelecer um perfil toxicológico para os MWCNT, por isso mais testes “*in vitro*” e “*in*

vivo” são necessários. Para que assim se possa explicar e entender sua utilidade e suas propriedades biológicas.

Estudos envolvendo a biocompatibilidade dos MWCNT vêm sendo cada vez mais aplicados, entre eles podemos citar suas interações entre células neuronais [31], osteoblastos [45], fibroblastos [32], anticorpos e sistema imune [27], canais de íons e membranas celulares [46].

Outros estudos também envolvendo células neuronais mostraram a biocompatibilidade de MWCNT “puros” (sem nenhum processo de ataque químico) e quimicamente funcionalizados, ocasionando um impacto positivo no crescimento de neurônios [31]. Camadas confluentes de neurônios foram disseminadas em modelos de superfícies de MWCNT litografadas (crescimento de MWCNT no formato de “ilhas” por CVD sobre substrato de quartzo). Depois de um período de incubação, as células foram encontradas ao redor das “ilhas”, inclusive interconexões axônicas entre as redes formadas, decorrentes da distribuição dos NTC [31]. Os MWCNT purificados e quimicamente funcionalizados com ácido carboxílico, também foram estudados como substrato para a extensão neuronal.

Foi examinada a adesão em função da formação de osso com células de osteoblastos para a possível utilização dos MWCNT em superfícies de implantes ortopédicos [45, 25, 47, 26]. O estudo se centralizou na proliferação de células de osteoblastos em comparação com os diâmetros das nanofibras de carbono [47]

Diversos estudos envolvendo propriedades de adesão e proliferação de osteoblastos, fibroblastos e células musculares, sobre nanocompósitos de polímeros e MWCNT vêm sendo amplamente explorados. Estudos comparativos entre nanocompósitos e materiais usualmente utilizados em implantes ortopédicos (Ti6Al4V e CoCrMo), mostraram uma melhor adesão dos osteoblastos nos nanocompósitos, e também não apresentaram efeitos citotóxicos [45, 25].

Investigou-se a adesão e a proliferação celular em superfícies modificadas e funcionalizadas de MWCNT alinhados por meio de processo oxidativos [48], onde formaram-se estruturas poligonais e piramidais. As células foram espalhadas por todas as superfícies e incubadas por um período de sete dias. As imagens utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram células isoladas (uma célula por polígono)

depois de um dia e, camadas confluentes após o período de sete dias. No entanto, não foi observado nenhum potencial citotóxico [32].

A toxicidade de nanotubos de carbono de paredes únicas (SWNTs) foi avaliada em células de queratinócitos humanas. Os resultados mostraram um aumento do stress oxidativo e a inibição de proliferação celular em resposta ao tratamento de células de queratinócitos expostas às partículas de SWNTs [49]. Em estudos mais avançados, utilizaram-se testes “*in vivo*” em ratos, onde se induziu animais a inalarem os MWCNT, onde os resultados mostraram injúria pulmonar, gerando granulomas multifocais [50]. A influência dos MWCNT em células queratinócitas humanas (HEK293) foi investigada com a intenção de explorar até que ponto os MWCNT são biocompatíveis. Os resultados mostraram que MWCNT podem inibir a proliferação de HEK293 podendo induzir a apoptose e decréscimo na habilidade de adesividade celular. No retorno, as células HEK293 podem também mobilizar a atividade de resposta para a secreção de “pequenas” proteínas isoladas [51].

Observando os estudos de biocompatibilidade realizados com MWCNT, nota-se que há uma grande controvérsia em relação aos seus resultados. Alguns apresentam problemas relacionados com a compatibilidade, quando a dispersão de MWCNT colocados em cultura celular, indicando a morte celular por problemas físicos e não químicos (apoptose celular, devido ao fato das mesmas englobarem os MWCNT). Porém, em testes de adesão celular as células se fixam sobre eles, e apresentam alta viabilidade celular.

Com os avanços na área de bioengenharia, torna-se cada vez mais importante estudar até que ponto as superfícies dos MWCNT e os materiais precursores para sua nucleação possam vir a influenciar no crescimento das células. Frequentemente utilizam-se MWCNT funcionalizados, com o objetivo de facilitar o reconhecimento celular, ou até mesmo ataque químico para ter um melhor controle sobre as dimensões dos tubos, já que estes fatores podem estar relacionados a melhores interações com o meio biológico.

Neste trabalho foram utilizados como catalisadores Fe e Ni e, como substrato, o titânio, que é considerado biocompatível. O crescimento de MWCNT verticalmente alinhados pela técnica CVD utilizando o ferro como catalisador já foram estudados [52]. Lee et al utilizou o Fe como catalisador em substratos de SiO₂ e Ti para o crescimento dos MWCNT. Compararam-se métodos de CVD intermitentes e convencionais, demonstrando

que o método CVD intermitente com multicamadas de Fe/Al é um método versátil para obtenção de MWCNT verticalmente alinhados com comprimento moderado.

Para avanços na área de recobrimento em próteses, seria importante avaliar o substrato/catalisador em que os MWCNT serão nucleados, onde desta forma poderia avaliar a influência que tais substratos teriam com o meio biológico e até que ponto estes aspectos influenciariam na aderência e proliferação celular, para possíveis aplicações da nanotecnologia em superfícies implantáveis.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS (MWCNT)

Os MWCNT são crescidos em duas etapas, no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS/INPE), as quais denominam Pré-Tratamento e Deposição. Para a deposição em substratos de titânio são necessários lixar as amostras (lixa 600) e fazer uma intercamada bem fina de TiN, realizada pelo aquecimento dos substratos a uma temperatura próxima de 400°C, após esta etapa faz-se a deposição de ferro e níquel (7nm de espessura). A deposição de Ni ou Fe (7nm) no substrato de titânio foi realizada em uma evaporadora por feixe de elétrons (Auto 306 –EB3 Multihearth Electron Beam Source – BOC Edwards). Para deposição dos MWCNT, utilizou-se um reator de plasma de microondas, onde inicialmente as amostras foram submetidas a uma etapa de pré-tratamento, a fim de criar “nanoclusters” de níquel e ferro, a partir dos quais os MWCNT serão nucleados.

Na figura 1 segue o esquema do reator de plasma de microondas onde é feita a etapa de pré-tratamento e deposição dos MWCNT.



Figura 1: Reator de microondas para o crescimento de nanotubos de carbono (MWCNT).

2.2 LINHAGENS CELULARES

2.2.1. Fibroblastos

A linhagem celular utilizada foi a CLL I NCTC (ATCC) clone 929-clone da linhagem L, tecido conjuntivo de camundongo, designado L-929. As células são cultivadas em Meio Mínimo Essencial – MEM (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino – SFB, 1% de antibiótico Antibiotic Antimycotic (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, em garrafas plásticas Nunc de 25cm³.

2.2.2. Osteoblastos

A linhagem celular utilizada foi o osteoblasto de tecido conjuntivo, designado como HOB. As células foram cultivadas em DMEM – mistura de sais minerais e aminoácidos – suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino – SFB, 1% de antibiótico Antibiotic Antimycotic (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, em garrafas plásticas Nunc de 25cm³.

As linhagens celulares foram mantidas no Laboratório de Dinâmica de Compartimentos da Universidade do Vale do Paraíba.

2.3 MANUTENÇÕES DA CULTURA CELULAR

Ambas as células foram mantidas, como estoque, em nitrogênio Líquido. Partindo deste, foi preparada uma garrafa de cultura de 25cm³, contendo 1 ml de cultura de células (10⁶ células/ml), adicionando-se 2 ml de meio de cultura MEM, enriquecido com 10% SFB, no caso dos fibroblastos, e DMEM, enriquecido com 10% SFB, no caso dos

osteoblastos. As células foram mantidas em estufa com controle automático de temperatura 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Olympus CK40. Estas células foram subcultivadas após tripsinização, quando formada uma monocamada confluenta. Após o período de 3 minutos com 2ml de tripsina as mesmas foram retiradas, adicionando-se 3 ml de meio de cultura MEM suplementado com 10 % de SFB, ou DMEM suplementado com 10% SFB. Para liberação das células da parede da garrafa, utilizou-se jato forte com o auxílio de pipetador automático. Deste volume serão retiradas alíquotas de 1 ml e passados para novas garrafas, adicionando-se mais 2 ml de meio MEM, ou DMEM suplementado com 10% SFB e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

2.4 TESTES DE CITOTOXICIDADE

A análise da biocompatibilidade consiste em uma seqüência de testes e inclui testes “*in vitro*” (usando células e tecidos), testes “*ex vivo*” (quando necessário), modelos animais e triagens clínicas. Várias diretrizes e procedimentos foram criados para esta finalidade, por exemplo: organizações padrões nacionais e internacionais (como a Sociedade Americana para Testes de Materiais, da sigla em inglês ASTM), organizações internacionais (como a Organização Internacional para Padronização, da sigla em inglês ISO), e agências federais internacionais (como a FDA e Instituto Nacional de Saúde, da sigla em inglês NIH).

Testes “*in vitro*” utilizando cultura de células foram utilizados com sucesso para avaliar a citotoxicidade de biomateriais. O modelo celular “*in vitro*” proporcionou uma alta versatilidade para analisar os aspectos da biocompatibilidade de biomateriais. Certamente, este modelo é muito para se estudar funções (e mecanismos pertinentes) de uma linhagem celular por um período de tempo; contudo, tal procedimento proporciona uma limitada visão do complexo celular do corpo humano. As células utilizadas são de culturas permanentes de linhagens provenientes de bancos de células (L-929, SaoS-2, HOB, CHO-

K1, Vero, etc). Cultura de células primária também são utilizadas, apesar de apresentarem uma menor reprodutibilidade, eficiência e em alguns casos, disponibilidade.

Três principais testes com célula são utilizados para analisar a biocompatibilidade: contato direto, difusão em ágar e extração celular . Os três ensaios diferem na maneira com o que o material é exposto à célula. Para padronizar estes ensaios e comparar os resultados, as variáveis de número de crescimento celular, tipo de célula, duração de risco, tamanho da amostra para teste e superfície da área de teste devem ser cuidadosamente controlados. Geralmente são preferíveis linhagens celulares permanentes na realização de crescimento “*in vitro*”, devido a sua maior reprodutibilidade e menor variabilidade nos resultados [53,54]. As linhagens de fibroblasto de camundongo (L929) são muito utilizadas em testes de biomateriais. Inicialmente esta linhagem foi selecionada devido a sua fácil manutenção de cultura e produziu resultados que possuem alta correlação com os biológicos [55]. Além disso, os fibroblastos são escolhidos por ser células que estão presentes em ferimentos e o principal tipo celular presente em regeneração. A escolha das linhagens celulares se baseia no tipo de análise que será realizada (viabilidade, atividade enzimática, receptores específicos, etc). Para validação dos testes são necessários controles positivos e negativos. A metodologia para testes com cultura de células primária são descritos pela U.S. Pharmacopeia, e padronizado pela ASTM, Instituto Padronização Inglesa (do inglês BSI), e ISO.

2.5 TESTES COLORIMÉTRICOS

O termo citotoxicidade significa causa de efeitos tóxicos (morte, alterações na permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática, etc) a nível celular. Sobretudo o teste de viabilidade celular “*in vitro*” é utilizado para verificar citotoxicidade aguda tais como: MTT e LDH, que foram os utilizados neste trabalho, e entre outros. Estes ensaios são baseados em absorção óptica e análise da diminuição da função celular, detectável por produtos de enzimas específicas que determinam atividades vitais.

O teste de MTT é um método desenvolvido para avaliar a viabilidade celular verificando a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Trata-se de um teste colorimétrico, baseado no uso do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), em que este é reduzido apenas por mitocôndrias viáveis. A redução do MTT, de cor amarelada, a azul de formazana ocorre apenas em células viáveis, sendo sua densidade diretamente proporcional ao número de células presentes [56].

O teste de LDH (lactato desidrogenase) é um marcador de membrana íntegra. A enzima lactato desidrogenase está presente em todo o citoplasma celular, e quando a membrana é danificada há um contato com o meio externo. Este teste detecta a presença da LDH no meio indiretamente devido à reação de redução do sal Tetrazolium INT que depende do LDH para que a reação ocorra. Esta enzima pode ser detectada pela ação catalítica e indireta de conversão do 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium cloro (INT) em outro corante solúvel em água, formazana. O LDH permite analisar o número de total de células viáveis, isto correlacionado com a proliferação das mesmas.

2.5.1 TESTE DE CITOTOXIDADE PELO MÉTODO DIRETO (MTT E LDH)

Para realização dos testes foram utilizadas várias amostras com área de 1 cm^2 , onde foram divididas em seus respectivos grupos, de acordo com o intervalo de dias aos quais serão avaliados. Foram utilizados um controle positivo (látex com 1 cm^2), e controle negativo (papel de filtro com 1 cm^2) e o crescimento celular sem a imersão do biomaterial para a validação do teste. As amostras foram divididas em 5 grupos, em placas para cultura de células com 24 cavidades estéreis e tratadas, sendo que juntamente às amostras, foram adicionados $30\mu\text{L}$ de concentrado celular (1×10^5 células/ml) em cada poço, completando com $470\mu\text{L}$ de MEM, onde se posicionou as amostras. Abaixo segue a tabela da distribuição das amostras com seus respectivos tempos de incubação antes dos testes.

Placas	Tempos (Hrs)	MWCNT Titânio (quantidade)	Controle Positivo (quantidade)	Controle Negativo (quantidade)
1	0	5	5	5
2	2	5	5	5
3	24	5	5	5
4	48	5	5	5
5	72	5	5	5
6	96	5	5	5

Tabela 1: Divisão dos grupos para os testes de citotoxicidade pelo método direto (MTT e LDH)

Para a leitura do MTT, após o período de incubação, as amostras foram retiradas, e em seguida os poços foram lavados com 300µL de PBS, e colocou-se 200µL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), numa concentração final de 0,5 mg/ml de MTT-formazana, deixando-as incubadas por um período de 1h em estufa. Após esta etapa retirou-se o MTT, e colocou-se 400µL do solvente DMSO sobre os precipitados de formazana, em seguida a placa foi mantida em agitação por 30 minutos para a solubilização dos cristais de formazana.

Para a leitura do LDH, após o período de incubação as amostras foram retiradas, e colocou-se 50µl (1/10 vol.) de solução de lise deixando-as incubadas por um período de 45 minutos. Após o período de incubação foram retiradas alíquotas de 50µl para teste, e colocou-se 100µl de corante deixando-as incubadas por um período de 30-40 minutos. E, após este período colocou-se 50µl de HCL para que a reação fosse interrompida.

A leitura da absorbância dos cristais de formazana, diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis, foi feita utilizando um leitor de ELISA Spectra Count com comprimento de onda de 570 nm e 490 nm, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata e em seguida normalizados conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Absorbância das Células das amostras} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância de Células Controle Positivo} - \text{Absorbância do Branco}} \times 100$$

2.6 TESTES DE ADESÃO CELULAR

Para a realização dos testes de adesão celular foram utilizadas 2 amostras de MWNTs. Os testes foram realizados em placa de petri, onde foi adicionado sobre o material 200 μ L de concentrado de células (1×10^6 células/ml) e 800 μ L de meio nutritivo, incubados por 48 h e 7 dias. Para a fixação das células utilizou-se uma solução de 1,1 ml de tampão cacodilato e 100 μ L de glutaraldeído e 800 μ L de paraformaldeído 4%, adicionando-se 1 mL em cada placa. Após esta etapa, desidratou-se a amostra, fazendo-se a remoção do cacodilato acrescentando-se e retirando-se soluções de etanol de 50 a 100%, com intervalos de 10 minutos por etapa. Em seguida, retirou-se a solução de etanol a 100% e adicionou-se uma solução de 50% de etanol e 50% de HMDS por 10 minutos. Após estas etapas retirou-se a solução de etanol e HMDS e adicionou-se 500 μ L de HMDS em cada poço deixando-se secar em temperatura ambiente. Para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura necessitou-se depositar a um filme de ouro sobre as amostras para melhor visualização das imagens.

CAPITULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme descrito no capítulo de materiais e métodos, para a obtenção dos nanotubos de carbono são necessárias duas etapas, denominadas: pré-tratamento e deposição.

As Figuras 2a e 2b mostram as nanopartículas formadas durante o processo de pré-tratamentos das amostras de titânio recobertas com filmes de ferro e níquel (7nm), respectivamente. Observa-se uma alta densidade de partículas presentes nas amostras de Titânio recobertas com ferro (7nm), comparando-se aos recobertos com níquel (7nm).

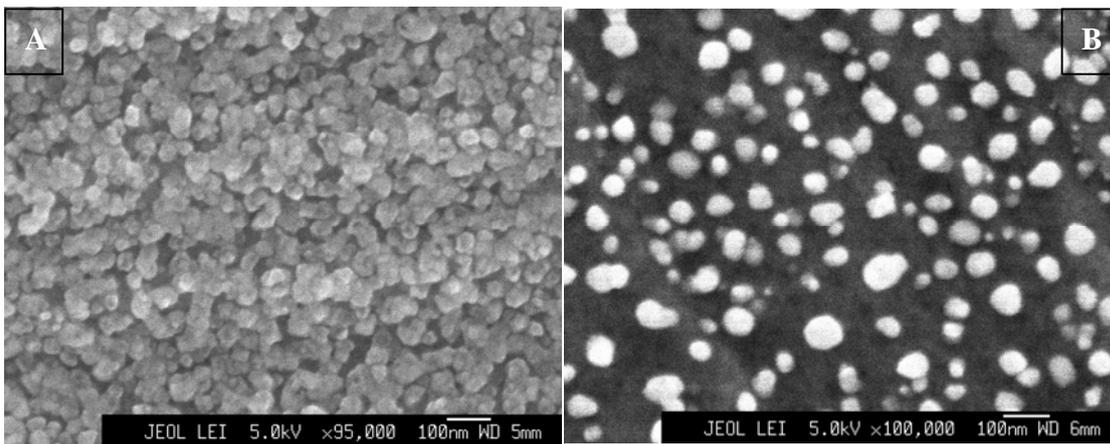


Figura 2: Nanopartículas formadas durante o processo de pré-tratamento, (A) amostras recobertas com filme de Fe e (B) amostras recobertas com filme de níquel.

As Figuras 3a e 3b mostram os MWCNT alinhados obtidos utilizando o titânio recoberto com ferro (7nm) e níquel (7nm), respectivamente. A influência da densidade de nanopartículas aumenta consecutivamente a densidade de MWCNT produzidos, tornando-o um processo mais eficiente.

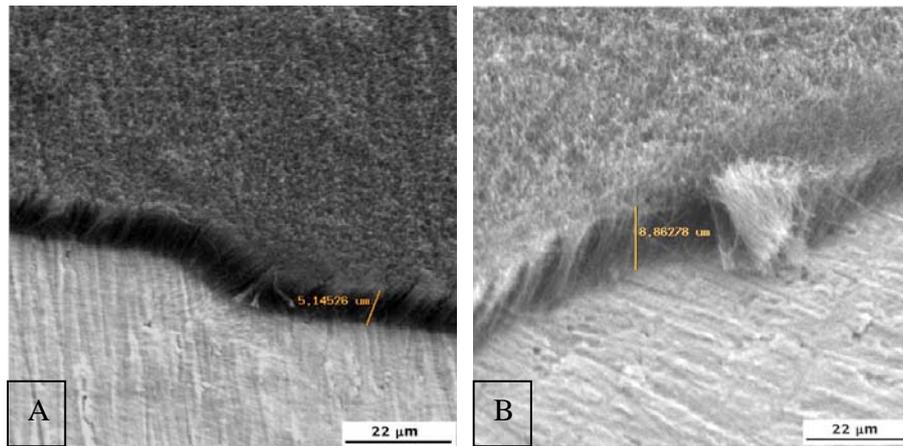


Figura 3: MWCNT alinhados obtidos utilizando ferro (A) e níquel (B) como catalisador.

A figura 4 mostra a estrutura interna típica dos MWCNT produzida pela técnica de plasma de microondas.

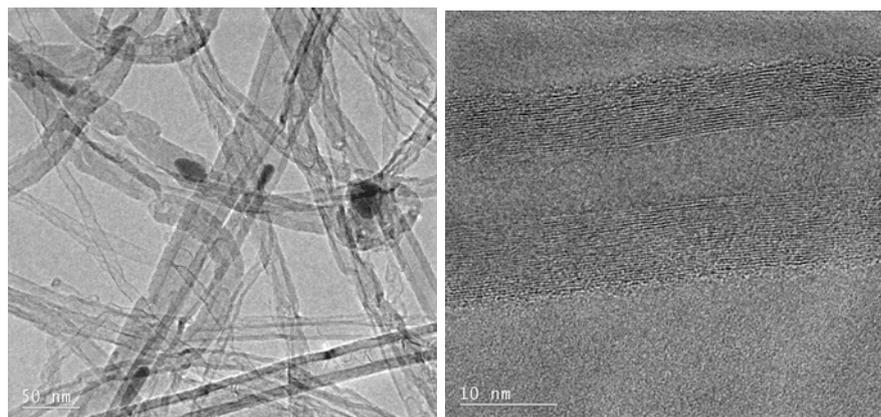


Figura 4: Estrutura interna do MWCNT, vista por Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM).

3.1 RESULTADOS DOS TESTES DE CITOTOXICIDADE COM FIBROBLASTOS

As Figuras 5a e 5b mostram os resultados obtidos com os testes de MTT e LDH, respectivamente. A atividade mitocondrial observada com as amostras de MWCNT obtidos com Ni e Fe como catalisadores são comparados com os controles negativos (papel de filtro) e positivos (látex) para citotoxicidade. A Figura 5a mostra densidade óptica obtida com o teste de MTT. Mostra incremento nos valores com o tempo de incubação com as amostras de MWCNT, e também com os controles positivos e negativos, em ambas havendo tendência para saturação. No controle positivo observamos um decréscimo celular, caracterizando morte celular. Comparando o controle positivo com os MWCNT, observamos que os mesmo se apresentam não-tóxicos a cultura. Resultados similares foram observados por Lobo et al., usando Ni como catalisador em superfície de Silício [29], com viabilidade celular em torno de 100%. Em outro artigo Lobo et al. observa uma menor compatibilidade dos MWCNT com Fe como catalisador, porém utilizando a técnica *dip coating*.

Na Figura 5, observamos uma alta viabilidade celular do Fe, no teste de MTT, o que indica que o catalisador utilizado pode influenciar nos resultados. O Fe (catalisador) foi obtido por evaporação por e-beam, sendo um método que se mostrou adequado devido à compatibilidade celular. Magrez et al. [37] mostram em seus testes que nanomateriais a base de carbono não se mostraram tóxicos em contato com culturas de células tumorais de pulmão no teste de MTT. Porém, há controvérsias com outros resultados obtidos. Tian et al. Mostra em seus resultados que nanomateriais a base de carbono (MWCNT, grafite, carvão ativo, carbono negro) apresentam efeitos tóxicos quando dispersos em cultura. Os autores observam que os catalisadores metálicos influenciam no ciclo de células de fibroblastos “*in vitro*” [57].

Worle-Knirsh et al. trouxe uma dúvida em relação à capacidade do teste de MTT em medir a viabilidade celular com amostras de MWCNT [37]. Eles observam que o produto do teste de MTT, cristais de formazana, interage com os MWCNT e formam um tipo de aglomerado, o que leva a uma medida de densidade óptica mascarada. Desta forma, o resultado apresentado com o teste de MTT, é diferente da viabilidade real [29,37]. Por isto, este tipo de teste possui algumas considerações em relação e metodologia utilizada.

Para evitar dúvidas sobre o teste de MTT realizado neste estudo, as amostras de MWCNT foram retiradas do meio de cultura antes do procedimento aplicado no teste. E, o mesmo com o controle positivo e negativo. Os resultados são correlacionados com as células aderidas na placa. A correlação direta entre as medidas de densidade óptica está assegurada, pois todas as amostras possuem o mesmo tamanho, sendo assim o espaço livre para adesão é sempre o mesmo.

Na Figura 5b são mostrados os resultados obtidos com o teste de LDH, e a interação dos MWCNT com as células de L929. A integridade da membrana celular encontrada com os MWCNT obtidos utilizando Fe e Ni como catalisador, foi comparada com os controles positivo e negativo. No controle positivo observamos claramente a morte celular. Observamos claramente que os MWCNT obtidos pelo processo de CVD, não afetam no crescimento celular, em comparação com o controle negativo. Estes resultados são complementares ao teste de MTT, indicando assim não-toxicidade. O teste de LDH com várias linhagens celulares (A549, ECV304) e MWCNT durante 24h e períodos mais longos, em diferentes concentrações foram, também, realizados por Worle-Knirsch. Onde não foram observadas reduções na viabilidade, e as alterações na concentração e no tempo de incubação não influenciaram significativamente na viabilidade celular [58,26].

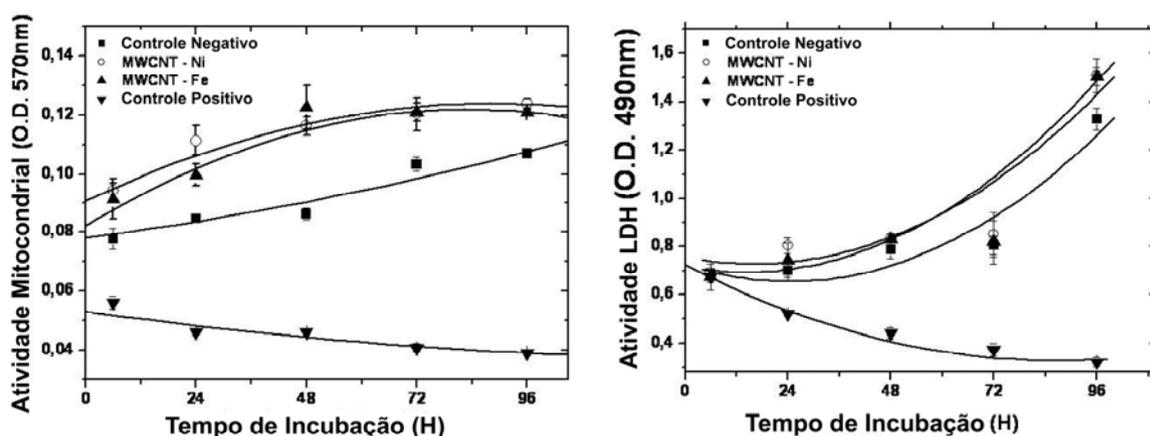


Figura 5: Análise da atividade mitocondrial (MTT) e LDH (LDH total) em células L929 em contato com MWCNT alinhados verticalmente, utilizando Fe e Ni como catalisadores, com tempos de incubação de 6, 24, 48, 72h. Os valores são expressos em densidade óptica de 570 nm (a) e 490 nm (b), respectivamente. O controle negativo é o filtro de papel. O controle positivo é o látex os resultados são a média \pm desvio padrão para n=5.

A figura 6 mostra a proliferação celular com amostras de MWCNT, em comparação com superfície de Titânio, utilizando o teste de LDH total. Os dados foram normalizados para densidade óptica (DO) utilizando como referência os valores obtidos com o Ti $[DO_{\text{teste}} - DO_{\text{branco}} / DO_{\text{titânio}} - DO_{\text{branco}}]$. Os resultados mostram uma alta significância ($p < 0001$) onde há um incremento no número de células que estão em contato com os MWCNT antes de 24h, comparado com o Titânio. No intervalo de 96h as diferenças são significantes ($p < 0.05$), que podem ser consideradas satisfatórias. De um modo geral, observou-se um aumento de 20% no número de células em contato com os MWCNT. Comparado com as células expostas ao controle positivo (alto grau de citotoxicidade) existe uma diferença significativa ($p < 0001$) dos valores obtidos. O comportamento das células expostas aos MWCNT é normal, onde há crescimento.

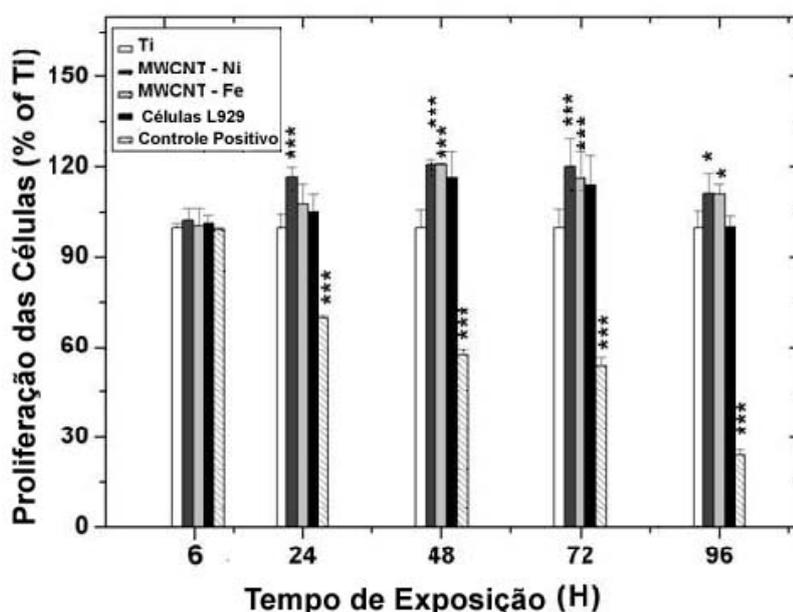


Figura 6: Análise da proliferação celular (L929) medido pelo teste de LDH total na interação com os MWCNT. A porcentagem da proliferação celular foi calculada por normalização de densidade óptica para células em contato com Titânio. Os resultados são a média \pm desvio padrão para $n=5$. ($p < 0001$ a interação é considerada extremamente significativa e $p < 0.05$ a interação é considerada importante).

3.1.1 RESULTADOS DOS TESTES DE CITOCOMPATIBILIDADE COM FIBROBLASTOS

Na Figura 7 podemos observar que ao longo dos períodos de incubação há um crescimento celular em ambos os substratos, onde as células se espalham por toda superfície. O comportamento normal de uma célula é observado em ambos os substratos, porém analisando a superfície com MWCNT observamos a formação de projeções da membrana celular sobre a superfície. As células se apresentam espalhadas e sem uma direção preferencial, adquirindo uma forma circular achatada sobre a superfície, observado em 6h. Após 7 dias, conforme mostrado na Figura 7G e 7H, as células praticamente cobrem todo o substrato, porém na superfície recoberta com MWCNT o número de células é significativamente maior do que na superfície de Titânio. Tal resultado, já foi observado anteriormente [29,30]. No intervalo de 48h, observamos a formação de uma camada onde as células vão de encontro das células vizinhas. Sobretudo também observamos algumas fendas sobre a superfície, o que indica que as células podem encolher durante o processo de secagem, separando-se das células vizinhas e puxando os MWCNT que estão em baixo. Observamos também, que as células da primeira camada se espalham apresentando uma preferência em se anexar aos MWCNT. Isto, porém é melhor observado na Figura 10.

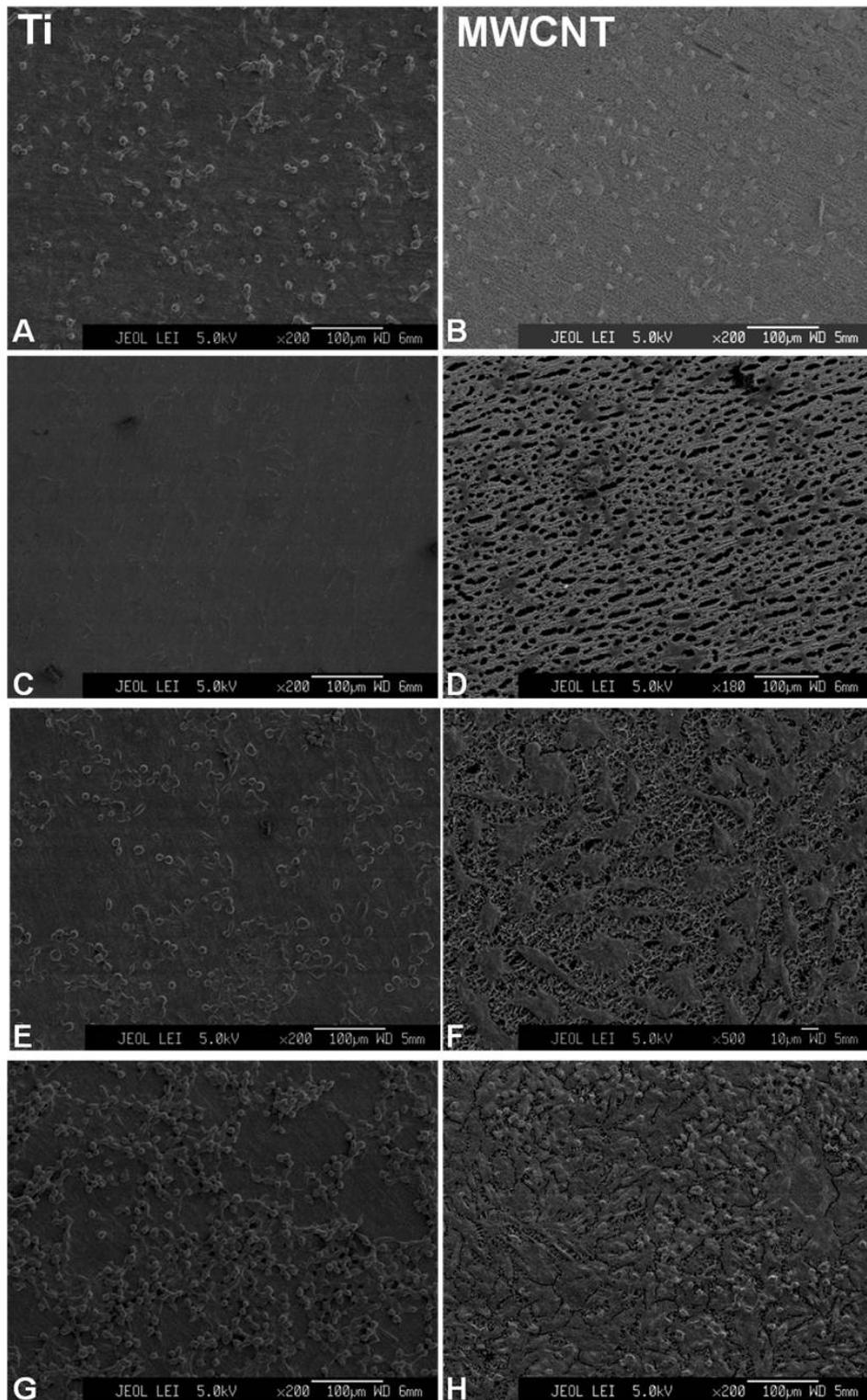


Figure 7: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da adesão celular em superfície de Titânio e MWCNT. Tempos de interação: 6h (A, B), 12h (C, D), 48h (E, F) e 7 dias (G,H).

Na Figura 8 observamos imagens de MEV com maior aumento, após 6h de incubação das células de L929 com Titânio (A) e com MWCNT (B,D). Esta figura, mostra em alta resolução, a fase inicial de adesão celular e a propagação celular em todas as direções da superfície recoberta por MWCNT, como observado anteriormente na Figura 7. Na Figura 8D observamos as projeções da membrana envolvendo os MWCNT, diferente da interação observada com o Titânio (Figura 8A).

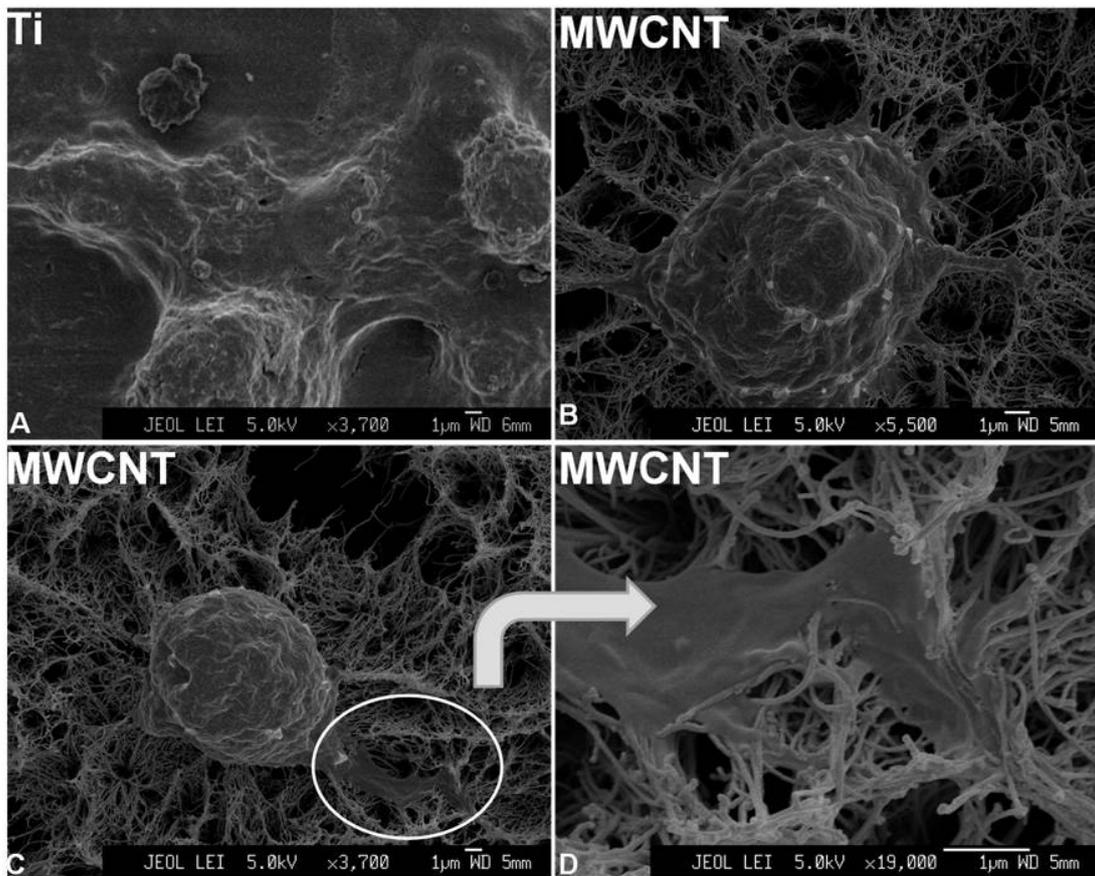


Figura 8: Imagens de MEV mostrando a interação das células L929 com a superfície de Ti e do MWCNT, após de 6h de incubação.

A Figura 9 mostra as imagens de alta resolução de adesão celular após 48h de incubação utilizando Fe como catalisador (A, C e E) e Ni (B, D e F). Apesar da alta densidade de MWCNT obtidos com Fe, não há diferença na adesão celular.

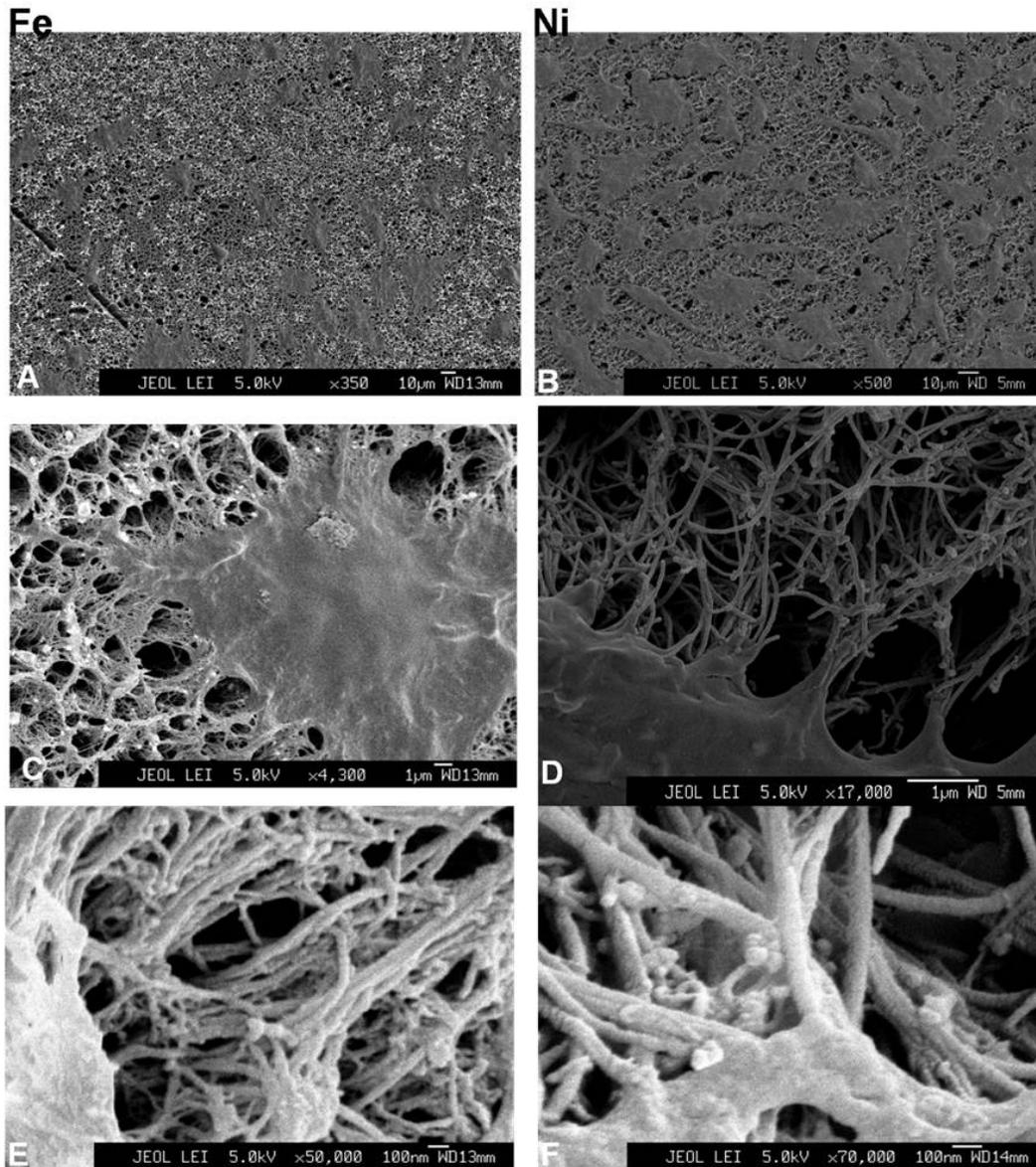


Figura 9: Imagens de MEV mostrando a interação das células de L929 com MWCNT utilizando Ni e Fe como catalisadores, após 48h de incubação.

A Figura 10 mostra as imagens de adesão celular sobre o Titânio e os MWCNT, após 7 dias de incubação. É observado um alto número de projeções da membrana nos MWCNT em comparação com o Titânio. Mostrado mais uma vez a preferência celular em se aderir aos MWCNT (Figura 10B). A Figura 10B, mostra a interface entre as células e os MWCNT. Esta figura ilustra porque as células apresentam um formato achatado em sua primeira camada, e que e mesma possui uma espessura relativamente uniforme. É difícil distinguir as projeções da membrana e os MWCNT, neste tipo de imagem, mas a alta interação entre as células e os MWCNT, indica que as projeções podem ocorrer com os MWCNT embaixo. A Figura 10D mostra em maior ampliação a região selecionada na Figura 10 C, onde são observadas interações nanométricas. As projeções da membrana possuem praticamente o mesmo diâmetro que os MWCNT. Isto indica que a primeira camada é suficiente para isolar o MWCNT das interações com as outras células. É conclusivo que a propagação celular é muito mais rápida que a divisão, e que é preferido pelas células na adesão ao MWCNT. O alinhamento do MWCNT é não-tóxico às células, uma vez que as células espalhadas por cima do filme sobrevivem por 7 dias.

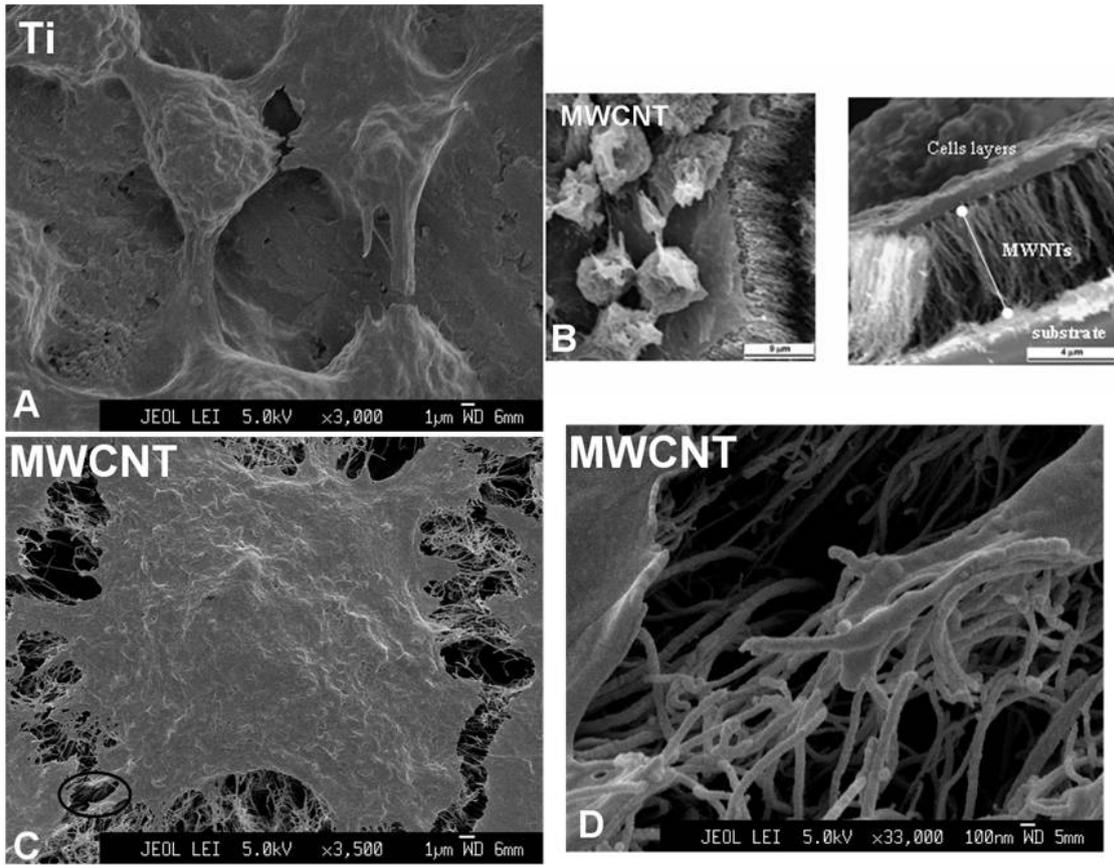


Figura 10: Imagens de MEV mostrando a interação das células de L929 com MWCNT utilizando Ni e Fe como catalisadores, após 7 dias de incubação.

3.2 RESULTADOS DOS TESTES DE CITOTOXICIDADE COM OSTEOLASTOS

O teste de LDH analisa a integridade da membrana celular, e, portanto a viabilidade das mesmas. O efeito do contato com os MWCNT pelo período de 72h foi avaliado pela morte celular, usando o teste de LDH liberado. A Figura 11 mostra a interação entre os MWCNT e os osteoblastos (HOB). A integridade da membrana celular (LDH liberado) encontrado com os MWCNT utilizando Fe e Ni como catalisador foi comparada com as células e com o controle positivo (Figura 11a), estes resultados mostram o efeito do controle positivo (látex) é extremamente significativo comparado com o MWCNT ($p < 0001$). A densidade óptica da célula é de fato a normalização do parâmetro de modo que se possa ser mostrado 100% de viabilidade (Figura 11b). O controle positivo mostra um alta ocorrência de morte celular, mesmo em pouco tempo de incubação. A normalização dos valores de densidade óptica prova viabilidade por volta de 100%, sendo assim nos MWCNT considerados não-tóxicos.

Para evitar dúvidas sobre o teste de LDH utilizado neste estudo, as amostras foram retiradas antes do procedimento do teste. Os resultados são apenas correlacionados com as células mortas sobre a superfície. O mesmo procedimento é realizado com os controles positivo e negativo. A correlação direta entre as medidas de densidade óptica é assegurado em todos os casos, pois as amostras possuem o mesmo tamanho, sendo assim o mesmo espaço para adesão celular. A partir disso, o alto valor de viabilidade celular obtidos mostra que os MWCNT podem estar relacionados com o aumento da proliferação celular. Alguns estudos mostram que as células preferem os MWCNT para se aderirem [58, 29, 30, 59, 46].

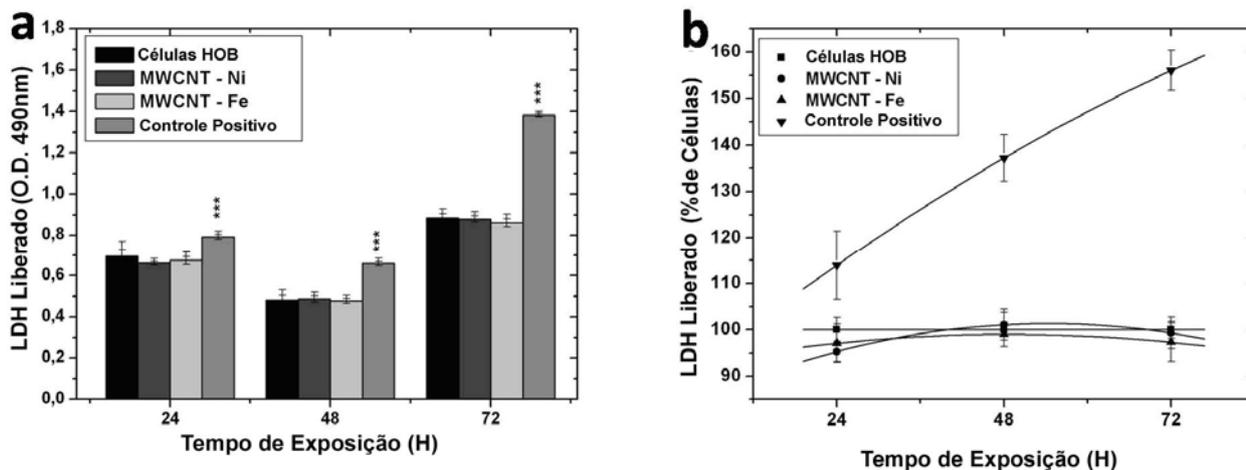


Figura 11: Viabilidade celular dos osteoblastos (HOB). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada por normalização de densidade óptica. Os resultados são a média \pm desvio padrão para $n=5$. ($p < 001$ a interação é consideravelmente importante)

3.2.1 RESULTADOS DOS TESTES DE CITOCOMPATIBILIDADE COM OSTEOBLASTOS

A Figura 12 mostra em imagens de MEV a interação entre os MWCNT e os osteoblastos. Em uma comparação geral, podemos observar que há uma alta proliferação celular sobre os MWCNT após um período de incubação de 7 dias. Estas características são aparentemente relacionadas com as dimensões dos MWCNT. Muitos autores estão desenvolvendo biomateriais nanoestruturados visando obter semelhança com as dimensões físicas de moléculas de proteínas, presentes na MEC [14]. Os estudos revelam que o contato das células com matérias nanométricos é decisivo para um crescimento celular eficiente, especialmente em superfícies recobertas com MWCNT [58,29,30]. A figura 12 mostra a evolução celular e as interações após 7 dias de incubação. Podemos observar uma alta proliferação celular sobre os MWCNT, entre os períodos de tempo estudados (6h e 7 dias).

A Figura 12-1a e 12-2a mostram a adesão celular após 6h. Neste período praticamente todas as células se espalham pela superfície recoberta com MWCNT. A fase inicial de interação célula / material mostra a capacidade de proliferação e diferenciação

celular. A Figura 12-1b e 12-2b mostram a interação após 24h, onde as células começam a emitir projeções de membrana. As células não apresentam uma direção preferencial apresentando um formato achatado sobre a superfície, porém as projeções de membrana demonstram um comportamento saudável das células. Este resultado é idêntico aos obtidos por Lobo et al. com células de fibroblastos [29,30].

A Figura 12-1d e 12-2d mostram as interações após 7 dias. Observa-se que as células formam uma monocamada sobre os MWCNT. Na Figura 12-3a observamos projeções de membrana ligadas com os MWCNT.

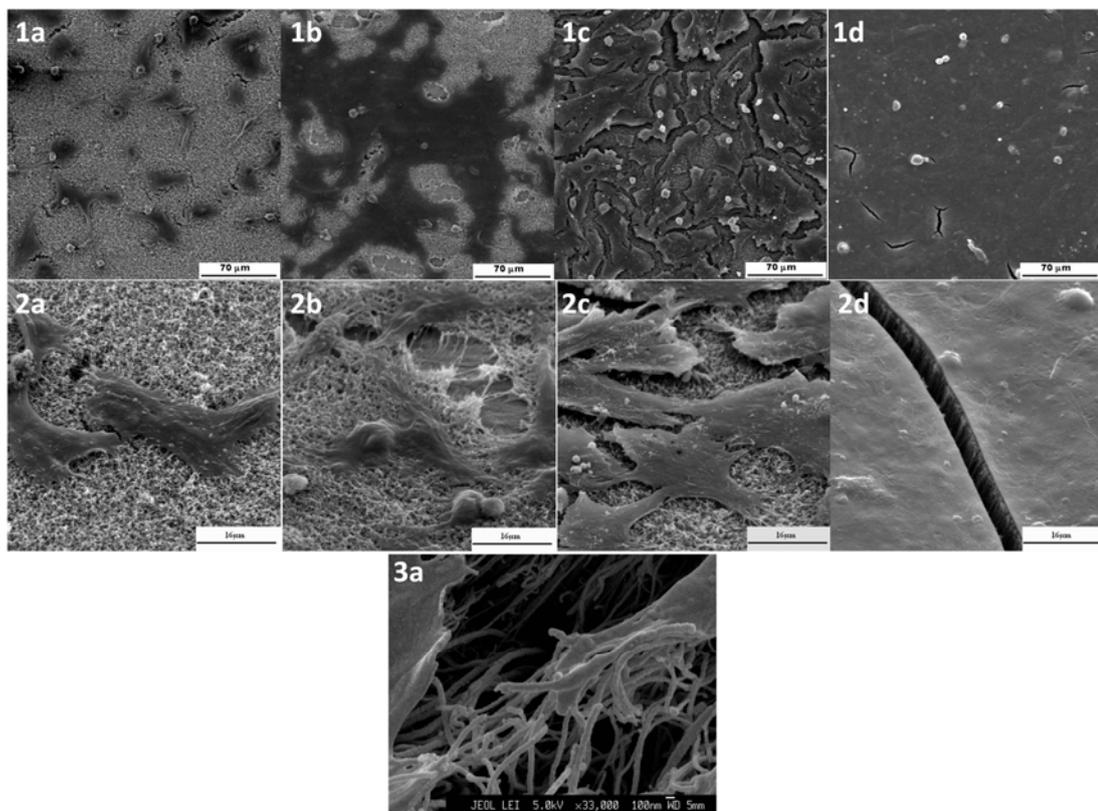


Figure 12: Imagens de MEV mostrando a interação celular das células de osteoblasto com MWCNT. As imagens 1a,b,c e d são com Ni como catalisador e 2a,b,c e d são com Fe. (1a, 2a) 6h de incubação, (1b, 2b) 24h de incubação (1c, 2c) 24h de incubação (1d, 2d) após 48h de incubação (3a) projeções de membrana em direção aos MWCNT. Aumento: (1a-1d) 500x; (2a-2d) 2000X; 3a) 33000X.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

Em conclusão, este trabalho apresenta altos níveis de biocompatibilidade de fibroblastos e osteoblastos com os filmes de MWCNT. O controle da espessura do catalisador, obtido pelo método de *e-beam* é essencial para a produção de MWCNT. Estes resultados evidenciam que não é necessária a funcionalização dos MWCNT, para que se alcance uma alta viabilidade celular. Basta, apenas que os MWCNT sejam puros, sem resíduos metálicos ou carbono amorfo sobre sua superfície. Possivelmente a interação entre as células e o espalhamento das mesmas sobre os MWCNT, se dá por interações físicas.

Conforme descrito anteriormente, podemos assumir que verticalmente alinhados os MWCNT imitam dimensionalmente as estruturas dos componentes da MEC, desta forma, podem promover interações com as proteínas responsáveis pela adesão celular. Estes resultados são muito importantes, pois demonstra eficiência no crescimento celular, o que estimula a utilização dos MWCNT em regeneração tecidual.

CAPÍTULO 5

TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de MWCNT produzidos pela técnica de CVD térmico e CVD por plasma de microondas, DC pulsado.
- Testes bactericidas com os MWCNT usando cepas de *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* e *Shigella Lexineri*.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. XU T (XU, TAO), ZHANG N (ZHANG, NING), NICHOLS HL (NICHOLS, HEATHER L.), SHI DL (SHI, DONGLU), WEN XJ (WEN, XUEJUN). **MODIFICATION OF NANOSTRUCTURED MATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS.** MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-BIOMIMETIC AND SUPRAMOLECULAR SYSTEMS. 2007, 27(3), PP. 579-594.
2. GOLDBERG, M; LANGER, R; JIA, X. **NANOSTRUCTURED MATERIALS FOR APPLICATIONS IN DRUG DELIVERY AND TISSUE ENGINEERING.** JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE, POLYMER EDITION, VOLUME 18, NUMBER 3, 2007 , PP. 241-268(28).
3. THOMAS V (THOMAS, VINOY), DEAN DR (DEAN, DERRICK R.), VOHRA YK (VOHRA, YOGESH K.). **NANOSTRUCTURED BIOMATERIALS FOR REGENERATIVE MEDICINE.** CURRENT NANOSCIENCE VOLUME: 2 ISSUE: 3 PAGES: 155-177 PUBLISHED: AUG 2006.
4. BHATTACHARYYA S (BHATTACHARYYA, SANJIB), GUILLOTT S (GUILLOTT, SAMUEL), DABBOUE H (DABBOUE, HINDA), TRANCHANT JF (TRANCHANT, JEAN-FRANCOIS), SALVETAT JP (SALVETAT, JEAN-PAUL). **CARBON NANOTUBES AS STRUCTURAL NANOFIBERS FOR HYALURONIC ACID HYDROGEL SCAFFOLDS.** BIOMACROMOLECULES VOLUME: 9 ISSUE: 2 PAGES: 505-509 PUBLISHED: FEB 2008.
5. CUI, DAXIANG. **ADVANCES AND PROSPECTS ON BIOMOLECULES FUNCTIONALIZED CARBON NANOTUBES.** JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, VOLUME 7, NUMBERS 4-5, APRIL/MAY 2007 , PP. 1298-1314(17).
6. PHAM, QP; SHARMA, U; MIKOS, AG. **ELECTROSPINNING OF POLYMERIC NANOFIBERS FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS: A REVIEW.** TISSUE ENGINEERING VOLUME: 12 ISSUE: 5 PAGES: 1197-1211 PUBLISHED: MAY 2006.
7. SALVETAT, J.P.; BONARD, J.M.; THOMSON, N.H. ET AL. **MECHANICAL PROPERTIES OF CARBON NANOTUBES.** APPLIED PHYSICS A: MATERIALS SCIENCE & PROCESSING, 69 (3): 255-60, 1999.
8. HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z. **IN VITRO MODELS OF BIOCOMPATIBILITY: A REVIEW.** DENT. MATER., MAY, 12(3):186-93, 1996.

9. ISO 10993-1. **BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES. PART 1: GUIDANCE ON SELECTION OF TESTS. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. GENEVA, 1992.**
10. ISO 10993-5. **BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES. PART 5: TESTS FOR CYTOTOXICITY: IN VITRO METHODS. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. GENEVA, 1992.**
11. SCHMALZ, G. **USE OF CELL CULTURES FOR TOXICITY TESTING OF DENTAL MATERIALS- ADVANTAGES AND LIMITATIONS. J. DENT., 22 SUPPL 2:S6-11, 1994.**
12. FRESHNEY, R.I. **CULTURE OF ANIMAL CELLS. A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE. 4.ED. NEW YORK: WILEY-LISS.**
13. WENNBERG, A.; HASSELGREN. G.; TRONSTAD, L. **A METHOD FOR TOXICITY SCREENING OF BIOMATERIALS USING CELLS CULTURED ON MILLIPORE FILTERS. J. BIOMED. MATER. RES., JAN, 13(1):109-20, 1979.**
14. LYGRE, H.; MOE, G.; SOLHEIM, E.; GJERDET, N.R. **BIOLOGICAL TESTING OF LEACHABLE AROMATIC COMPOUNDS FROM DENTURE BASE MATERIALS. ACTA ODONTOL. SCAND., 53: 397-401, 1995.**
15. BARILE, F.A. **MECHANISMS OF CYTOTOXICOLOGY: INTRODUCTION TO IN VITRO CYTOTOXICOLOGY MECHANISMS OF CYTOTOXICOLOGY. MECHANISMS AND METHODS. BOCA RATON, EDITORA CRC PRESS, CAP.2, P.27-45, 1994.**
16. HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z. **IN VITRO MODELS OF BIOCOMPATIBILITY: A REVIEW. DENT. MATER., MAY, 12(3):186-93, 1996.**
17. LEYHAUSEN, G.; ABTAHI, M.; KARBAKHSCH, M.; SAPOTNICK, A.; GEURTSSEN, W. **BIOCOMPATIBILITY OF VARIOUS LIGHT-CURING AND ONE CONVENTIONAL GLASS-IONOMER CEMENT. BIOMATERIALS, MAR, 19(6):559-64, 1998.**
18. COSTA, C.A.; HEBLING, J.; GARCIA-GODOY, F.; HANKS, C.T. **IN VITRO CYTOTOXICITY OF FIVE GLASS-IONOMER CEMENTS. BIOMATERIALS, SEP, 24(21):3853-8, 2003.**
19. BOGDANSKI, D.; KOLLER, M.; MULLER, D.; MUHR, G.; BRAM, M.; BUCHKREMER, H.P.; STOVER, D.; CHOI, J.; EPPLE, M. **EASY ASSESSMENT OF THE BIOCOMPATIBILITY OF NI-TI ALLOYS BY IN VITRO CELL CULTURE EXPERIMENTS ON A FUNCTIONALLY GRADED NI-NITI-TI MATERIAL. BIOMATERIALS, DEC, 23(23):4549-55, 2002.**

20. MAGREZ, A.; KASAS, S.; SALICIO, V.; PASQUIER, N.; SEO, J.W.; CELIO, M.; CATSICAS, S.; SCHWALLER, B.; FORRO, L. **CELLULAR TOXICITY OF CARBON-BASED NANOMATERIALS**. *NANO LETT.* 2006; 6; 1121 – 1125.
21. F.R. TIAN, D.X. CUI, H. SCHWARZ, G.G. ESTRADA AND H. KOBAYASHI, **CYTOTOXICITY OF SINGLE-WALL CARBON NANOTUBES ON HUMAN FIBROBLASTS**, *TOXICOL IN VITRO* 20 (7) (2006), PP. 1202–1212.
22. D.M. BROWN, I.A. KINLOCH, U. BANGERT, A.H. WINDLE, D.M. WALTER AND G.S. WALKER *ET AL.*, **AN IN VITRO STUDY OF THE POTENTIAL OF CARBON NANOTUBES AND NANOFIBRES TO INDUCE INFLAMMATORY MEDIATORS AND FRUSTRATED PHAGOCYTOSIS**, *CARBON* 45 (9) (2007), PP. 1743–1756.
23. S.K. MANNA, S. SARKAR, J. BARR, K. WISE, E.V. BARRERA AND O. JEJELOWO *ET AL.*, **SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBE INDUCES OXIDATIVE STRESS AND ACTIVATES NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR-KAPPA B IN HUMAN KERATINOCYTES**, *NANO LETTERS* 5 (9) (2005), PP. 1676–1684.
24. CHLOPEK, J.; CZAJKOWSKA, B.; SZARANIEC, B.; FRACKOWIAK, E.; SZOSTAK, K.; BEGUIN, F. **IN VITRO STUDIES OF CARBON NANOTUBES BIOCOMPATIBILITY**. *CARBON* 2006; 44; 1 106-1111.
25. PRICE, R.A.; WAID, M.C.; KAREN M. HABERSTROH, K.M.; ET AL. **SELECTIVE BONE CELL ADHESION ON FORMULATIONS CONTAINING CARBON NANOFIBERS**. *BIOMATERIALS* 2003; 24; 1877-1887.
26. ZANELLO, L.P; ZHAO, B; HU, H; HADDON, R.C. **BONE CELL PROLIFERATION ON CARBON NANOTUBES**. *NANO LETT.* 2006; 6; 562-567.
27. NAGUIB, N.N.; MUELLER, Y.M.; BOJUCZUC, P.M.; ET AL. . **EFFECT OF CARBON NANOTUBE STRUCTURE ON THE BINDING OF ANTIBODIES**. *NANOTECH.* 2005; 16; 567-71.
28. GIANNONA S, FIRKOWSKA I, ROJAS-CHAPANA J, GIERSIG M. **VERTICALLY ALIGNED CARBON NANOTUBES AS CYTocompatible MATERIAL FOR ENHANCED ADHESION AND PROLIFERATION OF OSTEOBLASTS-LIKE CELLS**. *J. NANOSC. AND NANOTEC.* 2007; 7; 1679-1683.
29. LOBO AO, ANTUNES EF, MACHADO AHA, PACHECO-SOARES C, TRAVA-AIROLDI VJ, CORAT EJ. **CELL VIABILITY AND ADHESION ON AS GROWN MULTI-WALL CARBON NANOTUBE FILMS**. *MATER. SCI. ENG. C* 2008; 28 (2); 264-269.
30. LOBO AO, ANTUNES EF, PALMA MBS, PACHECO-SOARES C, TRAVA-AIROLDI VJ, CORAT EJ. **BIOCOMPATIBILITY OF MULTI-WALLED CARBON**

NANOTUBES FILMS GROWTH TITANIUM AND SILICON SURFACES. MATER. SCI. ENG. C 2008; 28 (4); 532-538.

31. GABAY, T; JAKOBS, E.; BEM-JACOB, E. ET AL. **ENGINEERED SELF-ORGANIZATION OF NEURONAL NETWORKS USING CARBON NANOTUBE CLUSTERS. PHYSICA A 2005; 21; 350; 611-21.**

32. CORREA-DUARTE, M.A.; WAGNER, N.; ROJAS-CHAPANA, J. ET AL. **FABRICATION AND BIOCOMPATIBILITY OF CARBON NANOTUBE-BASED 3D NETWORKS AS SCAFFOLDS FOR CELL SEEDING AND GROWTH. NANO LETTERS. 2004; 4; 2233-2236.**

33. HARRISON BS, ATALA A. **CARBON NANOTUBE APPLICATIONS FOR TISSUE ENGINEERING, BIOMATERIALS (2007); 28; 344–353.**

34. S. FIORITO, A. SERAFINO, F. ANDREOLA AND P. BERNIER, **EFFECTS OF FULLERENES AND SINGLE-WALL CARBON NANOTUBES ON MURINE AND HUMAN MACROPHAGES, CARBON 44 (6) (2006), PP. 1100–1105.**

35. S. GARIBALDI, C. BRUNELLI, V. BAVASTRELLO, G. GHIGLIOTTI AND C. NICOLINI, **CARBON NANOTUBE BIOCOMPATIBILITY WITH CARDIAC MUSCLE CELLS, NANOTECHNOLOGY 17 (2) (2006), PP. 391–397.**

36. CHLOPEK, J.; CZAJKOWSKA, B.; SZARANIEC, B.; FRACKOWIAK, E.; SZOSTAK, K.; BEGUIN, F. **IN VITRO STUDIES OF CARBON NANOTUBES BIOCOMPATIBILITY. CARBON 2006; 44; 1 106-1111.**

37. WORLE-KNIRSCH, J.M.; PULSKAMP, K.; AND KRUG, H.F. **OOPS THEY DID IT AGAIN! CARBON NANOTUBES HOAX SCIENTISTS IN VIABILITY ASSAYS. NANO LETT. 2006; 6; 1261 – 1268.**

38. CASEY A, DAVOREN M, HERZOG E, LYNG F, BYRNE H, CHAMBERS G. **PROBING THE INTERACTION OF SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES WITHIN CELL CULTURE MEDIUM AS A PRECURSOR TO TOXICITY TESTING. CARBON 2007; 45(1): 34 –40.**

39. CASEY A, HERZOG E, DAVOREN M, LYNG FM, BYRNE HJ, CHAMBERS G. **SPECTROSCOPIC ANALYSIS CON .RMS THE INTERACTIONS BETWEEN SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES AND VARIOUS DYES COMMONLY USED TO ASSESS CYTOTOXICITY. CARBON 2007; 45(7): 1425 –32.**

40. HURT RH, MONTHIOUX M, KANE A. **TOXICOLOGY OF CARBON NANOMATERIALS: STATUS, TRENDS, AND PERSPECTIVES ON THE SPECIAL TISSUE. CARBON 2006; 44(6): 1028 –33.**

41. MONTEIRO-RIVIERE N, INMAN AO. **CHALLENGES FOR ASSESSING CARBON NANOMATERIAL TOXICITY TO THE SKIN. CARBON 2006; 44: 1070 –8.**

42. ZHANG LW,ZENG L,BARRON AR,MONTEIRO-RIVIERE NA.**BIOLOGICAL INTERACTIONS OF FUNCTIONALIZED SINGLE-WALL CARBON NANOTUBES IN HUMAN EPIDERMAL KERATINOCYTES.**INT J TOXICOL 2007;26(2):103 –13.
43. ISOBE H,TANAKA T,MAEDA R,NOIRI E,SOLIN N,YUDASAKA M,ET AL. **PREPARATION,PURIFICATION,CHARACTERIZATION,AND CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF WATER-SOLUBLE,TRANSITION-METAL-FREE CARBON NANOTUBE AGGREGATES.** ANGEW CHEM INT ED ENGL 2006;45(40):6676 –80.
44. SHIM, M., KAM, N.W.S., CHEN, R.J., LI, Y., DAI, H. **FUNCTIONALIZATION OF CARBON NANOTUBES FOR BIOCOMPATIBILITY AND BIOMOLECULAR RECOGNITION.** NANO LETT. 2002; 2; 285–288.
- 45.WEBSTER, T.J.; WAID, M.C.; MCKENZIE, J.L.; ET AL. **NANOBIOTECHNOLOGY: CARBON NANO-FIBERS ASIMPROVED NEURAL AND ORTHOPEDIC IMPLANTS.** NANOTECH. 15 (1): 48-54, 2005
46. SMART, S.K.; CASSADY, A.I.; LU, G.Q. ET AL. **THE BIOCOMPATIBILITY OF CARBON NANOTUBES.** CARBON 44 1034-1047, 2006.
47. ELIAS, K.E.; PRICE, R.L.; WEBSTER, T.J. **ENHANCED FUNCTIONS OF OSTEOBLASTS ON NANOMETER DIAMETER CARBON FIBERS.** BIOMATERIALS 23: 3279-87, 2002.
48. LIU, C.; BI, Q.; MATTHEWS, A. **TRIBOLOGICAL AND ELECTROCHEMICAL PERFORMANCE OF PVD TIN COATINGS ON THE FEMORAL HEAD OF Ti-6Al-4V ARTIFICIAL HIP JOINTS.** SURF. COAT. TECHNOL. 163–164:597–604, 2004.
49. MANNA, S.K.; SARKAR, S.; BARR, J.;ET AL. **SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBE INDUCES OXIDATIVE STRESS AND ACTIVATES NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR-KAPPA B IN HUMAN KERATINOCYTES.** NANO LETTERS 5 (9):1676-1684, 2005.
50. LAM, C.; JAMES, J. T.; MCCLUSKEY, R.; HUNTER, R. L. **PULMONARY TOXICITY OF CARBON NANOTUBES IN MICE 7 AND 90 DAYS AFTER INTRATRACHEAL INSTILLATION.** TOXICOLOGICAL SCIENCES 72 (1):44, 2003.
51. CUI, D.; TIAN, F.; OZKAN, C.S.; WANG, M.; GAO, H.. **EFFECT OF SINGLE WALL CARBON NANOTUBES ON HUMAN HEK293 CELLS.** TOXICOLOGY LETTERS, 155:73–85, 2005.
52. KATOK, K.V.; TERTYKH, V.A.; BRICHKA, S.Y. ET AL. **PYROLYTIC SYNTHESIS OF CARBON NANOSTRUCTURES ON NI, CO, FE/MCM-41. CATALYSTS MATERIALS CHEMISTRY AND PHYSICS** 96 (2-3): 396-401, 2006.

53. RAMIRES, P.A.; ROMITO, A; COSENTINO, F.; MILELLA, E. **THE INFLUENCE OS TITANIA/HIDROXYAPATITE COMPOSITE COATINGS ON IN VITRO OSTEOBLASTS BEHAVIOUR.** BIOMATERIALS, JUNE, 22(12):1467-74, 2001.
54. VIANA, R.I. **ESTUDO IN VITRO DA CITOCOMPATIBILIDADE DE POOL DE BMP CONJUGADO A HIDROXIAPATITA UTILIZANDO COMO OSSEOINDUTOR. TESTE (MESTRADO EM BIOLOGIA FUNCIONAL E MOLECULAR)- INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, UNICAMP, 79P, 2003.**
55. **BIOMATERIALS SCIENCE: AN INTRODUCTION TO MATERIALS IN MEDICINE, SECOND EDITION, 2004.** EDITED BY BUDDY RATNER, ALLAN HOFFMAN, FREDERICK SCHOEN, JACK LEMONS.
56. MOSMANN, T. **RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL: APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTOTOXICITY ASSAYS.** JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 65 (1-2): 55-63, 1983.
57. TIAN F, CUI D, SCHWARZ H, GG ESTRADA, KOBAYASHI H. **CITOTOXICITY OF SINGLE-WALL CARBON NANOTUBES ON HUMAN FIBROBLASTS.** TOXICOLOGY IN VITRO 2006; 20(7): 1202-1212.
58. GIANNONA S, FIRKOWSKA I, ROJAS-CHAPANA J, GIERSSING M. **VERTICALLY ALIGNED CARBON NANOTUBES AS CYTOCOMPATIBLE MATERIAL FOR ENHANCED ADHESION AND PROLIFERATION OS OSTEOBLASTS-LIKE CELLS.** J.NANOSC. AND NANOTEC. 2007; 7; 1679-1683.
59. M. SHIM, N.W.S. KAM, R.J. CHEN, Y. LI, H. DAI. **FUNCTIONALIZATION OF CARBON NANOTUBES FOR BIOCOMPATIBILITY AND BIOMOLECULAR RECOGNITION.** NANO LETTERS. 2(2202), 285-288.
60. S. MWENIFUMBO, M.S. SHAFFER, M.M. STEVENS. **J. EXPLORING CELLULAR BEHAVIOUR WITH MULTI-WALLED CARBON NANOTUBE CONSTRUCTS.** MATER. CHEM. 17 (2007), 1894-1902.

CAPÍTULO 7

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS

Artigos completos publicados em periódicos

1. LOBO, A. O. ; ANTUNES, E. F. ; PALMA, M. B. S. ; PACHECO-SOARES, C. ; TRAVA-AIROLDI, V. J. ; CORAT, E. J. . Biocompatibility of Multi-Walled Carbon Nanotubes grown on titanium and silicon surfaces.. Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems, v. xx, p. 1-7, 2008.
2. LOBO, A. O. ; ANTUNES, E. F. ; PALMA, M. B. S. ; PACHECO-SOARES, C. ; TRAVA-AIROLDI, V. J. ; CORAT, E. J. . Cell Viability and Adhesion on as Grown Vertically Aligned Carbon Nanotubes.. Materials Research Society Symposium Proceedings, v. 950E, p. D04-16-D04-18, 2007.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

3. PALMA, M. B. S. ; LOBO, A. O. ; ANTUNES, E. F. ; PACHECO-SOARES, C. ; CORAT, E. J. . Avaliação da citotoxicidade in vitro de superfícies recobertas por nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT). In: Encontro de Iniciação Científica do INPE, 2007, São José dos Campos. Livro de Resumos, 2007.
4. LOBO, A. O. ; PALMA, M. B. S. ; ANTUNES, E. F. ; PACHECO-SOARES, C. ; TRAVA-AIROLDI, V. J. ; CORAT, E. J. . EVALUATION OF CELL ADHESION ON VERTICALLY MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES FILMS BY SCANNING ELETRON MICROSCOPY. In: XXI - CSBMM - Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálises, 2007, Búzios. Proceedings XXI - SBMM, 2007. p. BB01.
5. PALMA, M. B. S. ; LOBO, A. O. ; ANTUNES, E. F. ; PACHECO-SOARES, C. ; CORAT, E. J. . AVALIAÇÃO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE DE FILMES

DE NANOTUBOS. In: Encontro de Iniciação Científica do INPE, 2006, São José dos Campos. Livro de resumos, 2006.

6. LOBO, A. O. ; ANTUNES, E. F. ; PALMA, M. B. S. ; PACHECO-SOARES, C. ; TRAVA-AIROLDI, V. J. ; CORAT, E. J. . Biocompatibility of Multi-Walled Carbon Nanotubes grown on titanium and silicon surfaces. In: V Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2006, Florianópolis. Proceedings, 2006.

Resumos publicados em anais de congressos

1. LOBO, A. O. ; ANTUNES, E. F. ; PALMA, M. B. S. ; PACHECO-SOARES, C. ; CORAT, E. J. ; TRAVA-AIROLDI, V. J. . Development of Nanocomposites aligned MWCNT/PLGA for. In: VII Encontro sobre diamante, carbono amorfo, nanotubos de carbono e materiais relacionados, 2007, Fortaleza. Livro de Resumos, 2007. p. 11-11.
2. CORAT, E. J. ; ANTUNES, E. F. ; LOBO, A. O. ; TRAVA-AIROLDI, V. J. ; PALMA, M. B. S. ; PACHECO-SOARES, C. ; PARDINI, L. C. ; MASSI, M. . Studies of carbon nanotube growth at LAS/INPE. In: VII Encontro sobre diamante, carbono amorfo, nanotubos de carbono e materiais relacionados, 2007, Fortaleza. Livro de Resumos, 2007. p. 32-32.
3. CORAT, E. J. ; LOBO, A. O. ; ANTUNES, E. F. ; PACHECO-SOARES, C. ; PALMA, M. B. S. ; TRAVA-AIROLDI, V. J. . Cell Viability and Adhesion on as Grown Vertically Aligned Carbon Nanotubes.. In: 2006 MRS Fall Meeting, 2006, Boston. Proceedings - Symposium D: Biosurfaces and Biointerfaces, 2006.

