

ESTUDO DA RESPOSTA BIOLÓGICA NO TI-CP TRATADO TERMICAMENTE

Haroldo Reis Alves de Macêdo

Doutorando em Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
haroldoram@gmail.com

Marina de Oliveira Cardoso Macêdo

Doutoranda em Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
nativabio@gmail.com.

Hugo Alexandre de Oliveira Rocha

Professor do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. hugo-alexandre@uol.com.br.

Custódio Leopoldino de Brito Guerra Neto

Professor do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. custodioguerra@yahoo.com.br.

Clodomiro Alves Junior

Professor Titular do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. clodomiro.jr@hotmail.com.

RESUMO

O titânio é um dos materiais mais utilizados para a fabricação de dispositivos biomédicos e por isso, passa por uma série de processos térmicos e/ou mecânicos que visam solucionar problemas frequentemente associadas ao processo de fabricação. Os tratamentos térmicos podem alterar de maneira significativa suas propriedades criando ou aliviando tensões residuais no material e conseqüentemente alterando a resposta biológica destes. Sabe-se da literatura que o crescimento e proliferação celular são fortemente influenciados pelas características da superfície à qual a cultura foi realizada. No presente trabalho, foram realizados diferentes tratamentos térmicos no titânio comercialmente puro a fim de estudar sua influência sobre o comportamento de células pré-osteoblásticas MC373-E1, quando cultivadas sobre a superfície dos mesmos. De um modo geral, as amostras tratadas em um maior grau de “agressividade” apresentaram maior número de células que as de menor “agressividade”.

PALAVRAS-CHAVE: Biomateriais, Titânio, Tratamento Térmico, Comportamento Celular

STUDY OF BIOLOGICAL RESPONSE IN HEAT TREATED TI-CP

ABSTRACT

Titanium is one of the most widely used materials for the manufacture of biomedical devices and therefore goes through a series of thermal processes and / or mechanics who aim to solve problems often associated with the manufacturing process. Heat treatment can significantly alter their properties by creating or relieving residual stresses in the material and consequently altering the biological response of these. It is known from the literature that growth and cell proliferation are strongly influenced by the characteristics of the surface to which the culture was performed. In this work, different heat treatments were

performed on commercially pure titanium in order to study its influence on the behavior of pre-osteoblastic cells -MC373-E1, when cultured on the surface thereof. In general, samples treated in a greater degree of "aggression" had more cells than those with lower "aggressiveness".

KEY-WORDS: Biomaterials, Titanium, Heat Treatment Cell Behavior

ESTUDO DA RESPOSTA BIOLÓGICA NO TI-CP TRATADO TERMICAMENTE

INTRODUÇÃO

A interação entre células e biomateriais depende da topografia, composição química e estrutura da superfície dos materiais (Kasemo, 2002, K. Anselme, 2000). Dentre os diversos materiais utilizados com finalidades biomédicas, destaca-se atualmente o titânio e suas ligas, para aplicações em dispositivos como próteses, implantes, stents, entre outros (B. Groessner-Schreiber, et al, 2003).

Para o uso do titânio em aplicações biomédicas é importante que suas características superficiais possibilitem uma maior e mais rápida resposta biológica. No caso de implantes há a necessidade de se definir uma superfície compatível com uma boa resposta biológica, isto é imperativo na pesquisa básica de implantes (Amarante, 2001).

Qualquer implante, uma vez em contato com o meio biológico, é caracterizado por mudanças dinâmicas em suas propriedades superficiais envolvendo uma cascata de reações que ocorre entre o meio biológico e o biomaterial formando um "filme de condicionamento" que modula as respostas celulares (Puleo, 1999). Tem sido observado que uma maior velocidade de crescimento de células osteoblásticas pode ser alcançada pela texturização da superfície do implante (Brunette, 1998; Sykaras, 2000).

Na busca por superfícies que supram a necessidade de obter uma resposta biológica mais rápida, várias pesquisas têm sido desenvolvidas, modificando as propriedades de superfície pelos mais variados processos (Silva, 2005) dentre os quais se destaca os métodos mecânicos, químicos e físicos de tratamento, que permitem obter os mais variados graus de texturas (Xuanyong, 2004).

Diversos trabalhos na literatura demonstram que, quando estruturas de titânio são submetidas a tratamentos térmicos, os problemas frequentemente associados ao processo de fabricação, podem ser contornados. Durante alguns tratamentos térmicos são criadas tensões residuais (por exemplo, tratamento térmico de têmpera) que podem ser proveniente de transformações de fases ou puramente de efeito térmico, outros tratamentos, no entanto visam justamente remover as tensões residuais existentes no material (por exemplo, tratamento térmico de revenimento). Os tratamentos térmicos objetivam, sobretudo, otimizar propriedades como resistência à fratura, resistência à fadiga e à dureza. Isso se dá criando e/ou aliviando as tensões residuais do processo de fabricação (Ahmed, 1998; O'Brien, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo principal o estudo da influência de diferentes tratamentos térmicos, na resposta celular. Os tratamentos térmicos foram

escolhidos por comporem uma serie de etapas de tratamentos termo-mecânicos, que alteram a estrutura original dos dispositivos, cruciais na fabricação de dispositivos. Observou-se neste estudo o comportamento de células *MC373-E1* cultivadas sobre discos de Ti-cp. Analisando por imagem os seguintes parâmetros: Números de células, diâmetro e morfologia celular.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Foram utilizados 21 discos de Ti cp medindo 15 mm de diâmetro por 1,5 de espessura, divididos em 4 grupos e 7 tratamentos diferentes. Para cada tratamento foram utilizados 3 discos, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Tratamentos térmicos realizados e simbologia utilizada.

Grupo	Símbolo	Dados do Tratamento	
G1	TSR	Têmpera	
G2	TR200	Têmpera, revenimento a 200°C	Figura 1(a)
	TR300	Têmpera, revenimento a 300°C	
	TR500	Têmpera, revenimento a 500°C	
G3	TT300	Tratamento Térmico a 300°C	Figura 1(b)
	TT500	Tratamento Térmico a 500°C	
G4	ST	Sem Tratamento	

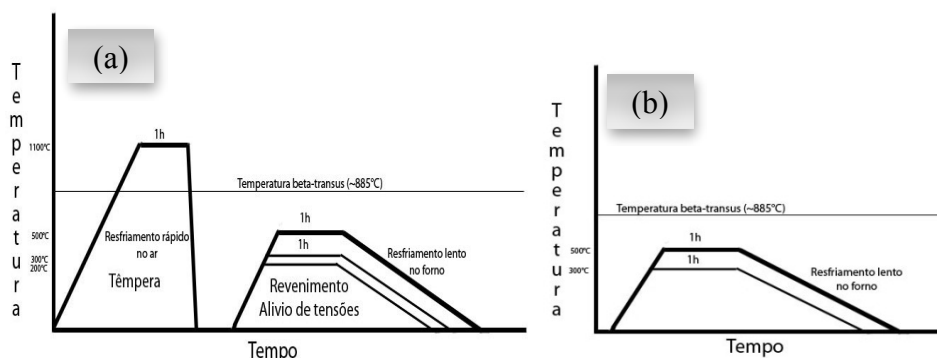


Figura 1 – Esquema dos tratamentos térmicos realizados. Em (a) é mostrado o tratamento de têmpera e revenimento e em (b) o tratamento térmico de alívio de tensões.

Os tratamentos térmicos foram realizados num forno hermeticamente fechado sob atmosfera inerte de argônio. Para a têmpera (grupo G1) as amostras foram aquecidas até uma temperatura no campo de fase beta (1100°C) e em seguida resfriadas bruscamente no ar, conforme mostra a figura 1a. Em seguida algumas das amostras já temperadas foram submetidas ao revenimento (grupo G2) em temperaturas diferentes (figura 1a), todas resfriadas lentamente no forno. O grupo G3 seguiu o mesmo procedimento do revenimento, porém neste caso as amostras não foram previamente temperadas, as temperaturas utilizadas são mostradas na figura 1b.

Após os tratamentos térmicos as amostras passaram por um rigoroso processo de preparação metalográfica. A camada de óxido superficial (formada durante a têmpera) foi removida por lixamento. Em seguida os discos foram polidos com uma solução de 40%

sílica coloidal e 60% peróxido de hidrogênio (30%). A limpeza dos discos, para remoção de impurezas e gorduras, foi realizada em ultrassom utilizando detergente enzimático (EndoZime AW-Plus), álcool etílico absoluto e água destilada, sendo 10 minutos para cada etapa.

Após a limpeza em ultrassom, os discos foram autoclavados por 30 minutos, secos e reservados para uso posterior. Utilizando uma câmara de fluxo laminar, colocou-se os discos numa placa de 24 poços, adicionando-se em seguida 1 ml de meio de cultura celular (ALFA-MEM) e finalmente 40 mil células pré-osteoblásticas (MC373-E1). A placa permaneceu em condição de cultura (5% de CO₂ e 37°C) por 24 horas. Completado esse período as células foram fixadas com solução de Karnouky para visualização em microscópio ótico de luz refletida. Antes da visualização no microscópio as células foram gradativamente desidratadas com concentrações de álcool variando de 70% a 100%.

Utilizou-se um programa analisador de imagens (Image Pro Plus 6.0) acoplado ao um microscópio ótico (Olympus BX60M) para estudar o comportamento das células sobre a superfície dos discos de titânio. As análises foram realizadas através de um recurso que permite contornar as áreas de interesse (no caso as células) e posteriormente obter os parâmetros desejados, tais como o número de células, o diâmetro médio e a morfologia das células aderida.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estado de tensão residual do material pôde ser avaliado através da análise dos espectros de DRX (figura 2), onde o alargamento da largura da meia altura do pico e os deslocamentos destes indica um aumento no estado de tensão residual do material. Essa tensão residual pode ser de dois tipos: do tipo I, ou seja, macrotensões que provocam deslocamento na posição dos picos, ou do tipo II, ou seja, microtensões internas que provocam o alargamento da largura da meia altura do pico. Estas tensões residuais, neste caso estão associadas ao tratamento térmico realizado.

Na tabela 2 é mostrado a comparação dos valores de 2θ , da distancia interplanar e da largura da meia altura (FWHM) do pico principal da fase alfa obtidos por difração de raios-x. Observa-se que os valores da largura da meia altura dos picos são maiores em todos os tratamentos, quando comparados com a amostra não tratada (adquirida no estado recozido) e que esses valores são maiores para os grupos G1 e G2, ou seja, para as amostras que sofreram o tratamento de têmpera.

Tabela 2 – Valores da distância interplanar e da largura da meia altura do pico principal da fase alfa, para os diferentes tratamentos térmicos.

	TSR	TR200	TR300	TR500	TT300	TT500	ST
2θ	39,4781	39,4891	39,5078	39,5097	39,5739	39,5158	39,4933
d	2,28077	2,28016	2,27912	2,27902	2,27547	2,27868	2,27993
FWHM	0,3735	0,3705	0,3572	0,3566	0,3383	0,3014	0,2455

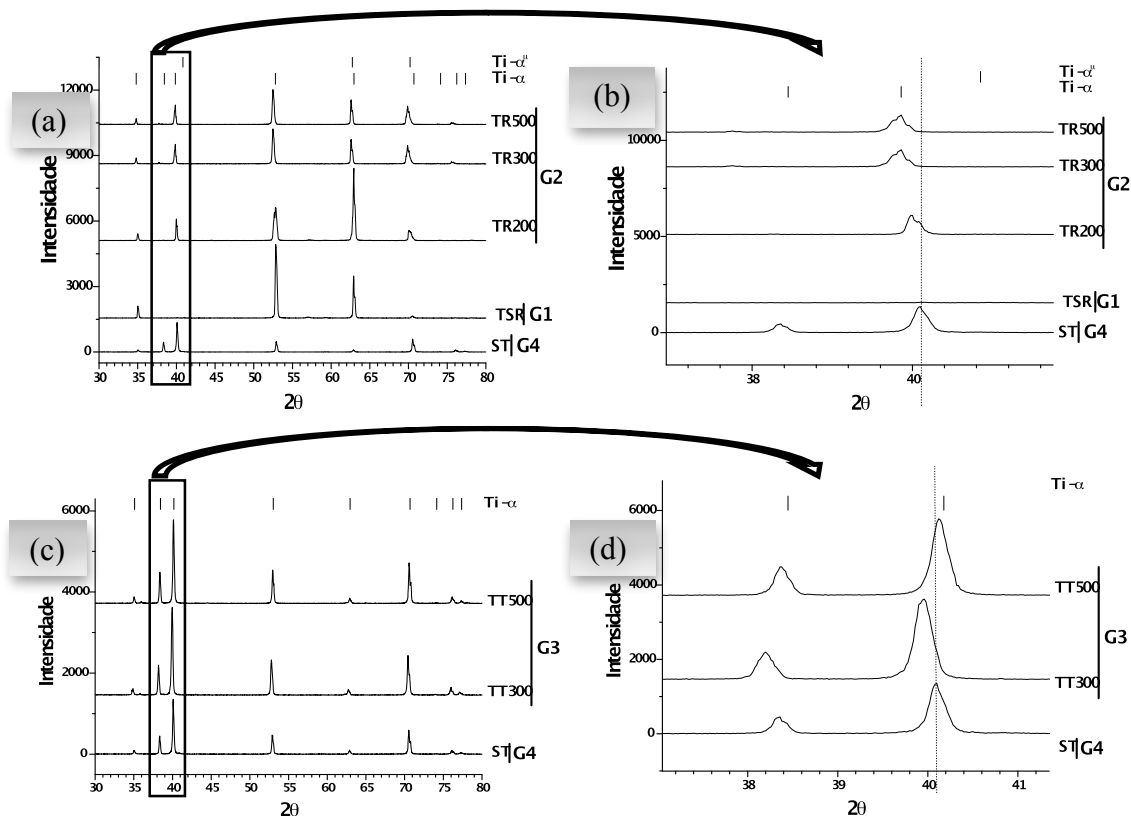


Figura 2 – Difratoograma para os discos do grupo G1, G2 e G4 (a); difratoograma para os discos do grupo G3 e G4 (c); zoom nos picos principais para os grupos G1, G2 e G4 (b) zoom nos picos principais para os grupos G1, G2 e G4 (d).

Para confirmar o estado de tensão residual proposto pela análise de DRX, foi realizado o teste de microdureza Vickers (figura 3). Analisando os resultados, pôde-se confirmar que os tratamentos dos grupos G1 e G2 introduziram nos discos maiores quantidades de tensões residuais e que esta, é tanto menor quanto maior for a temperatura de revenimento, para o caso das amostras do grupo G2. O alargamento e os deslocamentos dos picos juntamente com os resultados de microdureza indicam um maior estado de tensão residual para os discos tratados de forma mais “agressiva”.

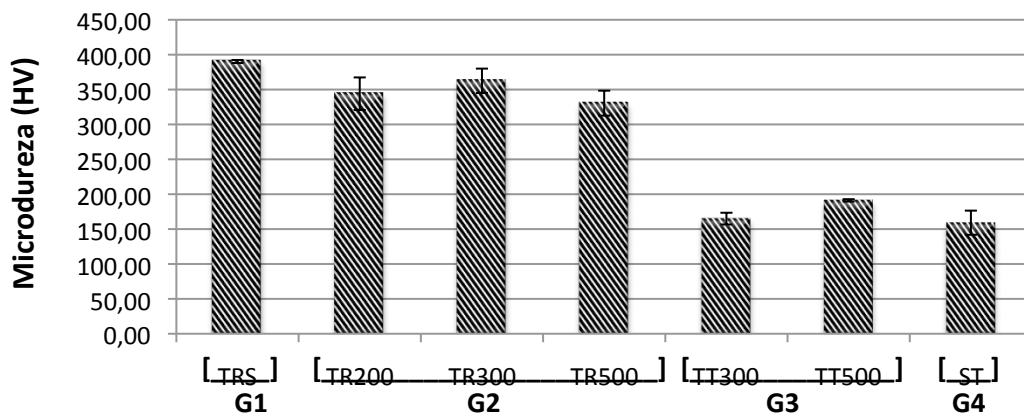


Figura 3 – Microdureza dos discos de Ti-cp para as diferentes condições de tratamentos realizados.

Analisando as imagens da cultura celular obtidas em microscopia ótica, verificou-se que os discos que apresentaram maior quantidade de células foram os discos do grupo G1 conforme é mostrado na figura 3. Considerando apenas os do grupo G2, verifica-se que o número de células é tanto maior quanto menor for temperatura de revenimento. Comparando-se os discos do grupo G3 com os do G4, não foi observado diferença estatística significativa quanto ao número de células aderidas.

Entretanto, é nítida e de significância estatística considerável a diferença entre o número de células aderidas nos discos dos grupos G1 e G2 quando comparados com os grupos G3 e G4 (figura 3). Em termos de significância estatística os discos do G1 se destacaram entre todos os demais tratamentos. De um modo geral verificou-se que quanto maior a tensão residual resultante do tratamento térmico realizado maior o número de células aderidas à superfície. Essa tendência pode ser um indicativo de que o aumento da tensão residual no material induz a um aumento na afinidade celular.

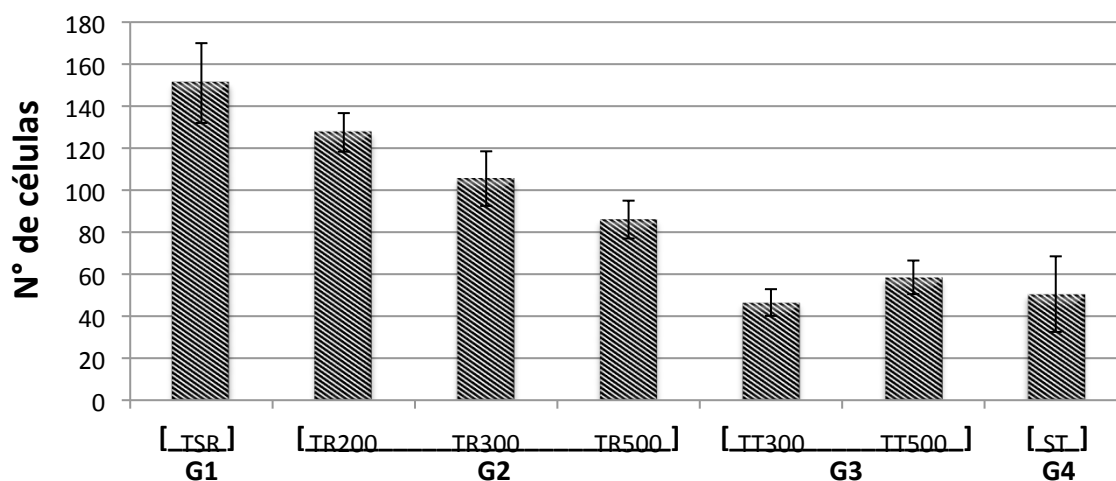


Figura 3 – Número de células aderidas na superfície dos discos de Ti-cp com diferentes tratamentos térmicos.

O diâmetro médio das células aderidas nas superfícies também variou com o tipo de tratamento térmico realizado. A figura 4 apresenta a distribuição diametral das células para as diferentes condições de tratamento. Verificou-se que para a condição TR500, células com diâmetro médio superior a 20 μm são mais abundantes que nas demais condições.

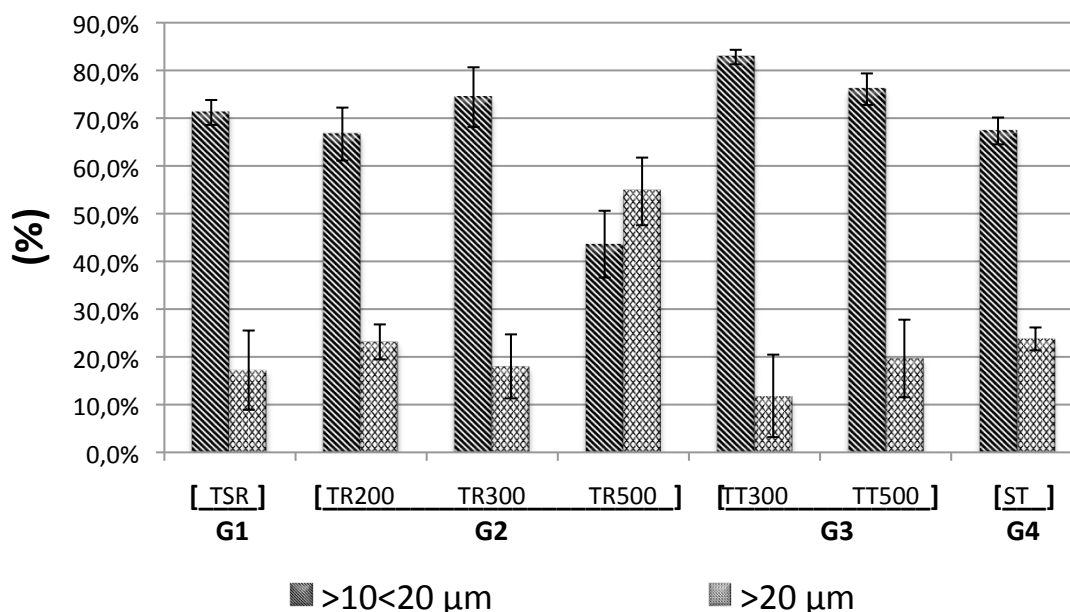


Figura 4 – Tamanho médio das células. Porcentagem de células por diâmetro em duas faixas de tamanho.

Analisando em termos de porcentagem, verificou-se que os discos apresentaram células com tamanho entre 10 e 20 μm. Quanto aos discos dos grupos G1 e G2 pôde-se perceber que nos discos TSR e TR300 mais de 80% das células tinham diâmetro médio entre 10 e 20 μm, enquanto que para os discos TR200 esse percentual caiu pra 70% e nos discos TR500 para 45%.

Considerando somente os dos grupos G3 e G4 (figura 4) observa-se que os discos TT300 têm aproximadamente 87% de células com tamanho entre 10 e 20 μm, enquanto que nos discos TT500 esse valor diminui para aproximadamente 79% e os discos ST foram aproximadamente 74%. Ou seja, embora para os tratamentos mais “agressivos” tenha sido obtido maiores quantidades de células, estas apresentaram-se menores em relação aos discos com menor número de células. Isso pode ser atribuído à concorrência por espaço, de modo que, os discos com menor número de células tinham mais espaço na superfície para que as células se espalhassem e tornassem-se maiores, enquanto que os discos com maior número de células, não.

Outra característica estudada foi a morfologia celular. Para o cálculo da morfologia fez-se a razão entre os diâmetros máximos e mínimos denominada de razão de aspecto. Quanto mais próximo da unidade for esta razão mais arredondada é a célula. Estabeleceu-se que para valores de razão de aspecto entre 1 e 1,5 a célula seria considerada arredondada e para valores superiores a 1,5 a célula seria alongada, (X. Zhu, 2004). Na figura 5 é apresentado resultado desta análise para os diversos tratamentos.

Para o tratamento TSR a maioria (~58%) das células apresentou-se arredondadas, assim como, para os discos tratados TT500. Isso pode ter acontecido devido à proximidade de uma célula com outra, o que limitou o crescimento desta. Para os discos do grupo G2 foi verificado um equilíbrio no número de células arredondadas e alongadas, o que também

pode ser atribuído ao grande número de células. Enquanto que os discos tratados TT300 e ST apresentaram uma maioria (~61%) de células alongadas, usando o mesmo argumento anterior, pode-se dizer que isso se deu devido ao baixo número de células aderidas à superfície.

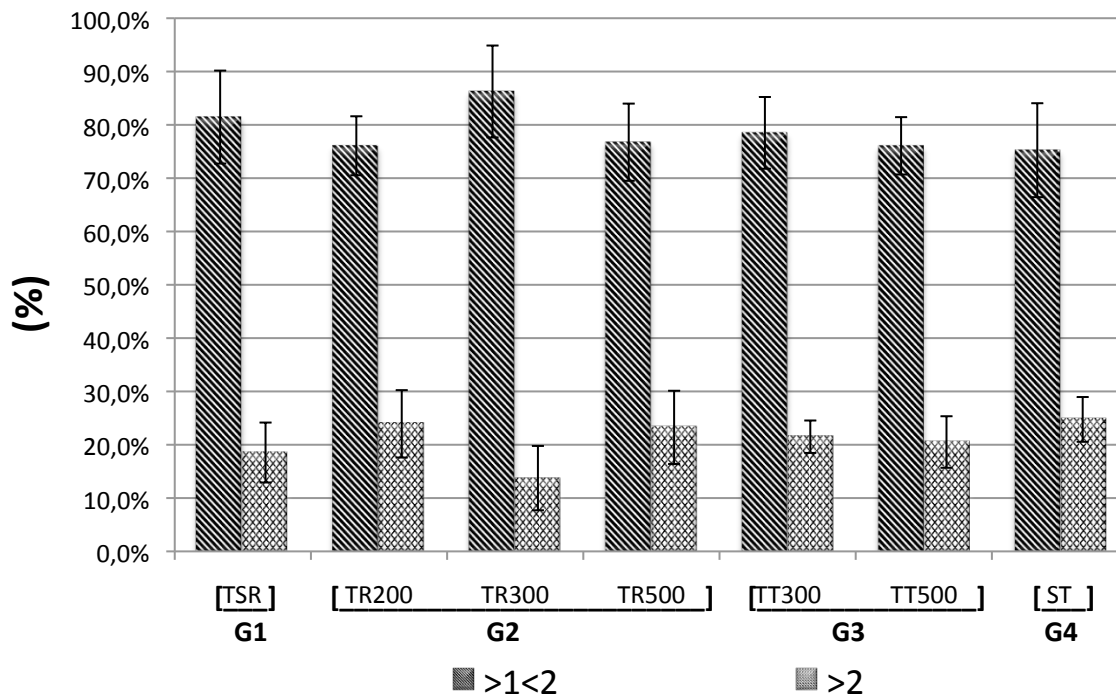


Figura 5 - Morfologia celular - análise da porcentagem de células em relação aos dois padrões morfológicos considerados.

CONCLUSÃO

Baseado no que foi proposto e realizado neste trabalho, bem como através da avaliação dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Foi encontrado um maior número de células nos discos temperados e que o número de células diminuíram conforme diminuiu o estado de tensão residual gerado pelo tratamento térmico.
- Em todos os tratamentos observou-se que o tamanho da maioria das células apresentou-se conforme o estabelecido pela literatura, ou seja, de 10µm a 20µm.
- Observa-se através desse trabalho que um conjunto de propriedades influenciam o crescimento e a adesão das células ao biomaterial.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, ao LABPLASMA e aos demais laboratórios que apoiaram este trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KASEMO, B. *Biological surface science*. Surface Science, Volume 500, Issues 1-3, 10 March 2002, Pages 656-677.
2. B. GROESSNER-SCHREIBER, A. NEUBERT, W.D. MULLER, M. HOPP, M. GRIEPENTROG, K.P. LANGE, J. Biomed. Mater. Res. 64A (4) (2003) 591.
3. ANSELME, K.; BIGERELLE, M.; NOEL, B.; DUFRESNE, E.; JUDAS, D.; IOST, A.; HARDOUIN, P. *Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses*. J. Biomed. Mat. Res., v.49, n.2, p.155-166, 2000.
4. AMARANTE, E. S.; LIMA, L. A. de. *Otimização das superfícies dos implantes: plasma de titânio e jateamento com areia condicionado por ácido – estado atual*. Pesqui Odonto Bras. 15 (2) (2001) 166-173.
5. PULEO, D. A.; NANCI, A. *Understanding and controlling the bone–implant interface*. Biomaterials 20 (1999) 2311–2321.
6. BRUNETTE, D. M. *The effects of implants surface topography on the behavior of cells*. Int J Oral Maxillifac Implants, v. 3, p. 231-246, 1998.
7. SYCARAS, N.; IACOPINO A. AND MARKER, V. A. *Int. J. Oral Maxillofacial and Implants*. 15 (5) (2000) 675.
8. SILVA, M. A. M.; MARTINELLI, A. E.; ALVES JR, C.; NASCIMENTO, R. M.; TÁVORA, M. P.; VILAR, C. D.. *Surface modification of Ti implants by plasma oxidation in hollow cathode discharge* Surface & Coatings Technology 20 (2005) 612 – 620.
9. XUANYONG L.; PAUL K. C.; CHUANXIAN D. *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*. Materials Science and Engineering. 47 (2004) 49–121.
10. AHMED T, RACK HJ. Phase transformations during cooling in $\alpha + \beta$ titanium alloys. Materials Science and Engineering. 1998; A243: 206-11
11. O'BRIEN JW. Structure and properties of metls and alloys. In: O'Brien JW. Dental materials and their selection. 2nd ed. Carol Stream: Quintessense Books; 1997. p. 175-86.
12. ZHU, X.; CHEN, J.; SHENEIDELER, L.; REICHL, R.; GERSTORFER, J. G. *Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses*. Biomaterials. V.25, p.4087-4103, 2004.