PROLIFERAÇÃO CELULAR EM DISCOS DE TITÂNIO GRAU 2 TEMPERADOS E REVENIDOS

Haroldo Reis Alves de Macêdo
Professor de Física do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Picos; Doutorando em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Tem experiência na área de tratamentos térmicos, biomateriais e caracterização de materiais. E-mail: haroldoram@ifpi.edu.br
Marina de Oliveira Cardoso Macêdo
Formada em Biologia pela Universidade Estadual do Piauí; Doutoranda em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Tem experiência na área de processamento de materiais por plasma. Atuando principalmente em modificação de biopolímeros. E-mail: marinalabplasma@gmail.com
Raniere Fagundes de Melo Silveira
Biomédico pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte e Doutorando pela mesma instituição em Bioquímica. Experiência na avaliação de efeito de polissacarídeos em diversos tipos celulares em cultura, incluindo análise da sinalização celular, bem como a determinação de atividade antioxidante e anticoagulante de várias classes de moléculas. E-mail: ranierebiomedicina@yahoo.com.br
Custódio Leopoldino de Brito Guerra Neto
Professor Adjunto da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Doutor em Ciências e Engenharia de Materiais, Departamento de Engenharia Biomédica DEB. Email: custodioguerra@yahoo.com.br
Natália de Freitas Daudt
Mestranda em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Trabalha com processamento de materiais por plasma. E-mail: nataliadaudt@hotmail.com
Hugo Alexandre de Oliveira Rocha
Professor da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Paulo. E-mail: hugo-alexandre@uol.com.br
Clodomiro Alves Junior
Professor Titular do departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Doutor em Ciências e Engenharia de Materiais, Departamento de Engenharia Mecânica, Email: clodomiro.jr@hotmail.com

RESUMO
O titânio é um biomaterial de grande aceitação em aplicações biomédicas devido às suas propriedades. Existem várias formas de modificar essas propriedades, dentre as quais os tratamentos térmicos e/ou termomecânicos. Neste trabalho discos de titânio comercialmente puro grau 2 foram tratados termicamente por têmpera e revenimento, o que proveu uma grande variedades de microestruturas sobre as quais foi cultivado células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 por 24h. Foram analisadas as propriedades de ângulo de contato, tensão superficial, bem como a proliferação celular. Observou-se que os discos do grupo G1 foram os que apresentaram maior número de células e que estas estavam parcial ou completamente espraiadas embora não tenham apresentados os melhores valores para o ângulo de contato.

PALAVRAS-CHAVE: Titânio, Tratamento Térmico, Proliferação Celular.

CELL PROLIFERATION IN GRADE 2 TITANIUM DISKS QUENCHED AND TEMPERED

ABSTRACT

Titanium is a material widely accepted in biomedicla applications due to is excelente physical and chemical properties. Among these properties, wettability (hydrophilic/hydrophobic balance), strong influence on the adhesion and growth of cells on the surface. During the manufacturing process the implantable material is subjected to changes due to structural and surface heating/processing. In order to study the effects of changes in physicochemical properties caused by thermal treatments observed in cell culture procedure, it was carried out a heat treatment by water quenching (1373K, 1273K and 1223K) and tempering (723K and (923K for 4 h) in sample of titanium discs. The characterization of the treated material was done by contact angle measuring, surface tension and optical microscopy. It was then carried out cell culture (MC3T3 – E1) for 24h. after that cell proliferation assay (MTT), optical microscopy and image analysis was conducted. It was observed that discs quenched at 1373K showed a higher number of cells and better wettability between the quenched discs. Based on results it was possible to obtain moderately hydrophilic surfaces with similar values of total superficial tension, however, it was seen that the proportions between the polar and dispersive components are different.

KEYWORDS: Titanium, Thermal treatment, Cell proliferation.

PROLIFERAÇÃO CELULAR EM DISCOS DE TITÂNIO GRAU 2 TEMPERADOS E REVENIDOS

INTRODUÇÃO

A interação entre células e biomateriais depende da topografia, da composição química e da estrutura superficial dos materiais [1,2]. Dentre os diversos materiais utilizados com finalidades biomédicas, atualmente o titânio e suas ligas se destacam quando empregados em dispositivos como próteses, implantes, stents, entre outros [3]. Para o uso do titânio em aplicações biomédicas é importante que suas características superficiais possibilitem uma maior e mais rápida resposta biológica.

Na busca por superfícies que supram a necessidade de obter tal resposta biológica, várias pesquisas têm sido desenvolvidas, modificando as propriedades de superfície pelos mais variados processos [4] dentre os quais se destaca os métodos mecânicos, químicos e físicos de tratamento, que permitem obter os mais variados graus de texturas [5].

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 que podem ser proveniente de transformações de fases ou puramente de efeito térmico, outros tratamentos, no entanto, visam remover as tensões residuais existentes no material. 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 [6, 7].

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 termomecânicos, que alteram a estrutura original dos dispositivos, cruciais na fabricação de dispositivos. Observou-se neste estudo o comportamento de células MC3T3-E1 cultivadas sobre discos de Ti-cp. Analisando por imagem os seguintes parâmetros: Números de células, diâmetro e morfologia celular.

METODOLOGIA

Os tratamentos térmicos foram realizados em forno tubular hermeticamente fechado em atmosfera de ar. Para a têmpera (G1) as amostras foram aquecidas em três temperaturas (1100°C, 1000°C, 950°C) e resfriadas em água. Para alívio de tensões (revenimento) foram utilizadas duas temperaturas: 500°C (G2) e 700°C (G3), sendo ambas resfriadas no forno, conforme mostra a figura 1.

(a)

Grupo	Simbologia	Tratamento
G1	11	Têmpera 1100°C-1h
	10	Têmpera 1000°C-1h
	95	Têmpera 950°C-1h
G2	11R5	Têmpera 1100°C-1h+Revenido 500°C-4h
	10R5	Têmpera 1000°C-1h+Revenido 500°C-4h
	95R5	Têmpera 950°C-1h+Revenido 500°C-4h
G3	11R7	Têmpera 1100°C-1h+Revenido 700°C-4h
	10R7	Têmpera 1000°C-1h+Revenido 700°C-4h
	95R7	Têmpera 950°c-1h+Revenido 700°C-4h
G4	ST	Sem Tratamento (comercial)

(b)

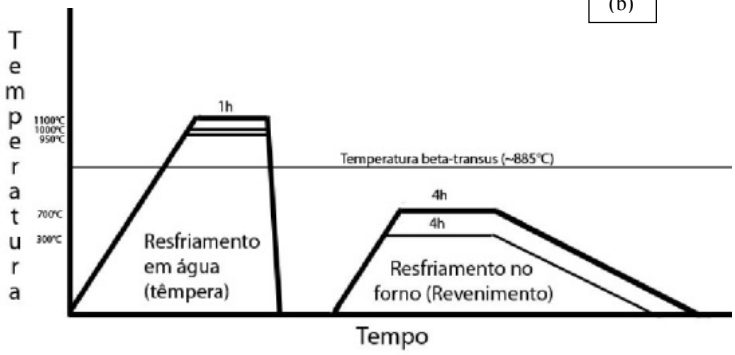


Figura 1 – (a) Nomenclatura e simbologia utilizada e (b) esquema dos tratamentos realizados.

Após os tratamentos térmicos as amostras passaram por um processamento metalográfico de lixamento e polimento, bem como por limpeza em ultrassom utilizando detergente enzimático (EndoZime AW-Plus), álcool etílico absoluto e água destilada, sendo 10 minutos para cada etapa. Após a limpeza, os discos foram autoclavados por 30 minutos, secos e reservados para uso posterior.

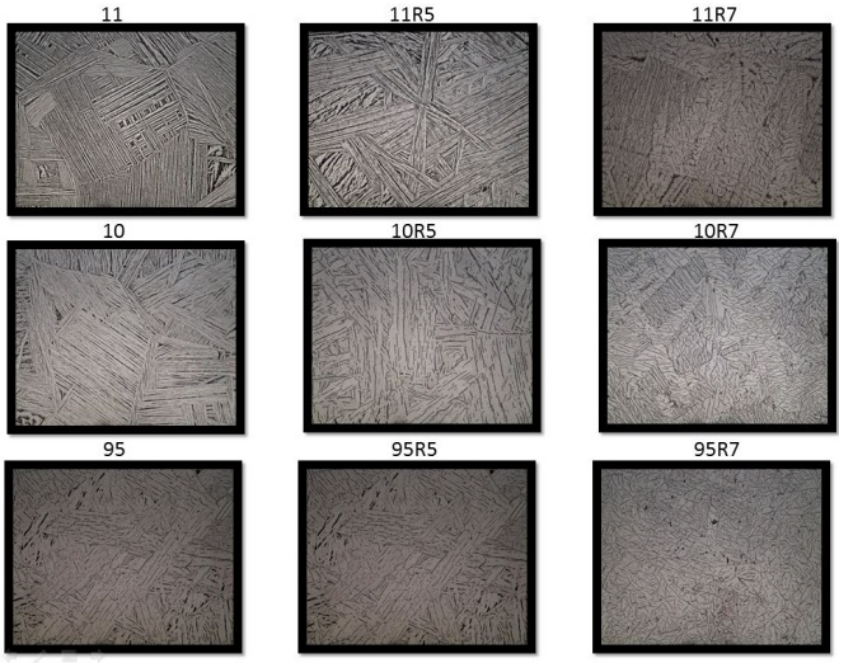
Utilizando uma câmara de fluxo laminar, colocou-se os discos numa placa de 24 poços, adicionando-se em seguida 1 ml de meio de cultura celular (ALFA-MEM) e *4·104* células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1). A placa permaneceu em condição de cultura (5% de CO2 e 37°C) por 24 horas. Completado esse período as células foram fixadas com solução de álcool etílico absoluto para visualização em microscópio ótico de luz refletida.

A proliferação celular foi analisada por MTT e por um programa analisador de imagens (Image Pro Plus 6.0). As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio ótico (Olympus BX60M). Em seguida as imagens foram analisadas de modo a obter o número de células, o diâmetro médio e a morfologia das células aderida.

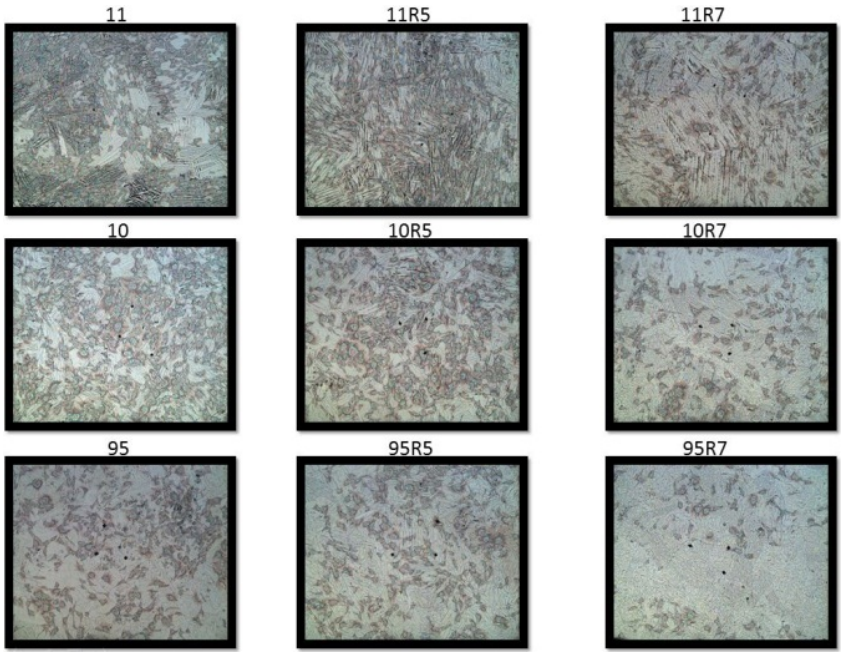
A técnica utilizada na determinação do ângulo de contato foi o da gota séssil. Os líquidos usados foram água, formamida e glicerol. A aquisição das imagens foi feita utilizando o software Pinnacle studio 8.5 e a medição do ângulo de contato foi feita utilizando o software Surftens 3.0. De posse dos valores dos ângulos de contato calculou-se a tensão superficial utilizado-se a aproximação de Fowkers.

RESULTADOS

A figura 2 apresenta a microscopia ótica da superfície dos discos os quais foram submetidos à cultura de células. Na figura 2a observa-se as diferentes microestruturas (aumento de 500x) obtidas para os tratamentos térmicos realizados. Nos discos do grupo G1 a microestrutura é rica em grãos aciculares grossos (estrutura martensita) enquanto que a microestrutura dos discos dos grupos G2 e G3 esses grãos grossos tornam-se mais refinados de modo que retornaria à microestrutura inicial se o tempo de revenimento fosse suficiente. Entretanto para todos os tratamentos foram observados apenas fase alfa e alfa martensite. Na figura 2b é mostrado a células aderidas sobre os discos (aumento de 100x). Com isso foi observado que de fato as células se aderiram à superfície.



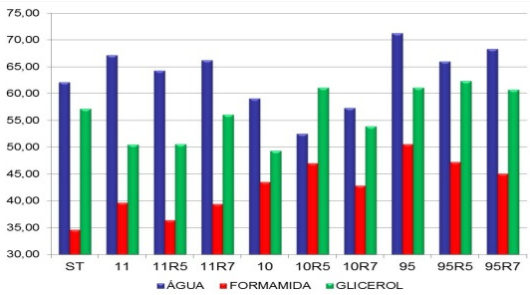
(a)



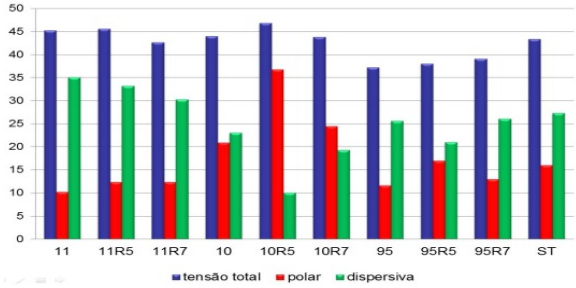
(b)

Figura 2 – (a) microestrutura obtida com os tratamentos de têmpera e revenimento e (b) microscopia ótica das células aderidas aos discos tratados.

Analisando o ângulo de contato da água (figura 3a) foi observado que em todos os tratamentos obtiveram-se superfícies moderadamente hidrofílicas mesmo havendo diferenças nos valores dos ângulos de contato. De acordo com a literatura para os menores valores de ângulo de contato da água deveria ter maior número de células aderidas. Isto não foi observado neste trabalho, conforme mostrado na figura 4. Os valores da tensão superficial total foram semelhantes, no entanto ocorreu uma grande variação nos valores das componentes polar e dispersiva, conforme a figura 3b.



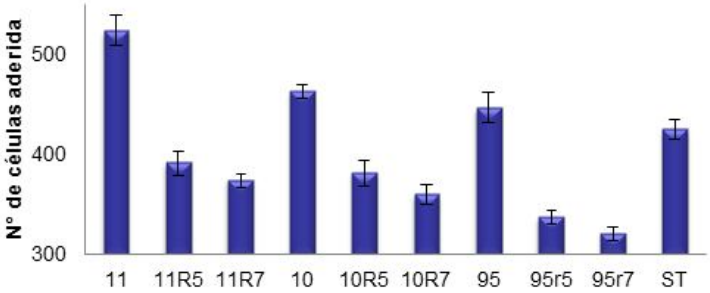
(a)



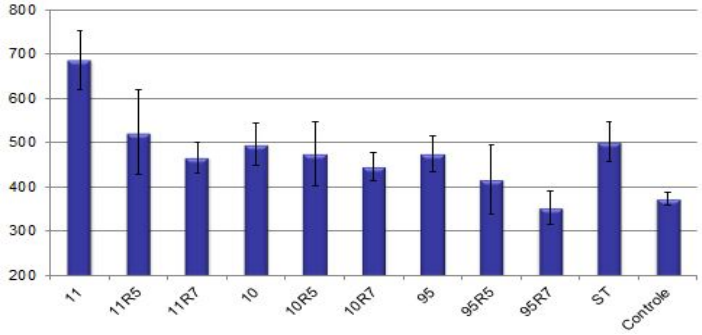
(b)

Figura 3 – (a) valores medidos para os ângulos de contato para os três líquidos utilizados na medição da tensão superficial e (b) tensão superficial total e suas componentes polar e dispersiva.

As células aderidas à superfície após 24h foi quantificada (figura 4a) analisando-se imagens na mesma região das imagens da figura 2b com aumento de 500x. Quantificação essa confirmada através de MTT, conforme é mostrado na figura 4b.



(a)



(b)

Figura 4 – número de células aderidas aos discos tratados em (a) medição por análise de imagens e em (b) por MTT.

Observou-se um maior número de células nos discos do grupo G1, isso pode ser atribuído à tensão residual do material uma vez que à medida que essas tensões residuais são aliviadas por tratamento térmico de revenimento a 500°C (grupo G2) e 700°C (grupo G3) o número de células diminui. Esse comportamento já foi observado por Macedo 2011 [8].

Analisando a morfologia das células sobre a superfície através da razão de aspecto utilizando como referencia o trabalho de Zhu 2004 [9]. Observou-se que não houve células arredondadas (não espraiadas) em todos os tratamentos realizados e sim um grande número de células completamente espraiadas, conforme pode ser verificado na figura 5. Esse espraiamento acentuado ocorrido nas células indica uma boa adesão ao substrato (superfície).

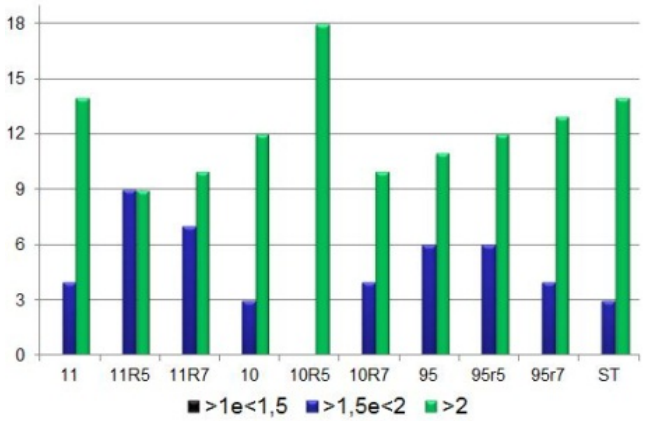


Figura 5 – Morfologia celular

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que com os tratamentos térmicos realizados foi possível obter diferentes microestruturas e diferentes propriedades superficiais e com isso uma resposta biológica distinta para cada condição de tratamento. De modo que os discos do grupo G1 foram os que apresentaram maior número de células.

AGRADECIMENTOS

À UFRN, ao CNPq, ao LabPlasma

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KASEMO, B. Biological surface science. 2002; 3:656-677.
2. ANSELME, K.; BIGERELLE, M.; NOEL, B.; DUFRESNE, E.; JUDAS, D.; IOST, A.; HARDOUIN, P. J. Biomed. Mat. Res. 2000; 49:155-166.
3. B. GROESSNER-SCHREIBER, A. NEUBERT, W.D. MULLER, M. HOPP, M. GRIEPENTROG, K.P. LANGE, J. Biomed. Mater. Res. 2003; 64: 591-593.
4. SILVA, M. A. M.; MARTINELLI, A. E.; ALVES JR, C.; NASCIMENTO, R. M.; TÁVORA, M. P.; VILAR, C. D. Surface & Coatings Technology. 2005; 20:612–620.
5. XUANYONG L.; PAUL K. C.; CHUANXIAN D. Materials Science and Engineering. 2004; 47:49–121.
6. AHMED T, RACK HJ. Materials Science and Engineering. 1998; A243:206-211
7. O'BRIEN JW. Dental materials and their selection. 2nd ed. Carol Stream: Quintessense Books; 1997. p. 175-86.
8. Macedo, H.R.A.; MACEDO, M.O.C.; ROCHA, H.A.O.; GUERRA NETO, C.L.B.; ALVES Jr. C. Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde. 2011; 1:4-12.
9. ZHU, X.; CHEN, J.; SHENEIDELER, L.; REICHL, R.; GERSTORFER, J. G. Biomaterials. 2004; 25:4087-4103.