

FUNDAÇÃO OSWALDO ARANHA CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM MATERIAIS



"Estudo da adesão celular em placas de Ti

comercialmente puro após o tratamento de mistura

de ácidos "

Líliam Carmo de Castro

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sinara Borborema Gabriel Coorientadora: Prof^a. Dr^{<u>a</sub>. Monique Osório Talarico da Conceição}</u>

> Volta Redonda – RJ 2017

OBJETIVO

O trabalho em questão tem por objetivo estudar a adesão celular em placas de Ti comercialmente puro após o método de tratamento químico com mistura de ácidos, em concentrações diferentes, com posterior análise através de microscopia eletrônica de varredura e cultura de células.

Confecção de miniplaca;

• MEV;

• Difração de Raio X .

Tratamento superficial com mistura de ácido
Cultura de células

MATERIAIS E MÉTODOS Confecção de miniplaca; Miniplaca de titânio confeccionada através de frezagem na Máquina Romi Discovery d800, com rotação de 3000 rpm com avanço de corte de 200mm/min partir de uma placa de 1,5mm de espessura para confeccionar uma mini placa do sistema 2.0 mm (refere-se ao diâmetro dos furos, relacionando com o perímetro de contato que o parafuso terá com o osso), com 4 furos, em formato de "L" preconizada para o tratamento de luxação recidivante.

Confecção de miniplaca;

A placa possui as seguintes metragens: comprimento maior de 23mm, comprimento menor de 11mm, espessura de 1.5mm, diâmetro do furo de 2mm.

MATERIAIS E MÉTODOS Confecção de miniplaca;

Placa confeccionada



Fonte: Autor, 2017.

DRX

As amostras, na condição polida, foram analisadas em um difratômetro marca Shimadzu, modelo XRD 6000 (EEL / USP), nas seguintes condições: radiação CuK α (λ = 1,5418 Å) com monocromador de grafite, tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, varredura (2 θ) de 30 a 90 graus, passo angular de 0,05 º e tempo de contagem de 5 s por ponto. As fendas utilizadas foram: divergência: 0,5 º, espalhamento: 0,5 º e receptora: 0,15 mm.

DRX

As fases presentes foram verificadas através de difratogramas simulados no programa de computador ORIGIN versão 8.0.

DRX

Difratômetro de Raio X do UniFOA.



Fonte: Autor, 2017.

Q

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para as análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) as amostras foram preparadas seguindo técnicas metalográficas usuais (embutimento, lixamento e polimento).

MATERIAIS E MÉTODOS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) As amostras foram embutidas em processo de duração de 25 minutos no total, sendo que utilizada resina baquelite marrom granulada, iniciando com 13 minutos de aquecimento até 180ºC, atingindo uma pressão de trabalho de 100KgF/cm³, seguindo por 12 minutos de resfriamento ate 40ºC.

MATERIAIS E MÉTODOS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) As amostras foras lixadas com lixas de carbeto de silício na seqüência de 180 a 1500. Após o lixamento, foram polidas com pano para polimento supra e pasta de diamante com 6 μ m por 4 minutos, 3 μ m por 3 minutos e 1 μ m por 3 minutos.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Em seguida as amostras passaram por um ataque químico para revelar a microestrutura, utilizando-se uma solução de mistura de Kroll (6 ml de HNO_3 , 3 ml de HF e 100 ml de H_2O). Foram atacadas por imersão, por tempos variados de 10 s.

As imagens foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Varredura TM3000 HITACHI.

MATERIAIS E MÉTODOS Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Microscópio eletrônico de varreduraTM3000 HITACHI



Fonte: Autor, 2017.

Tratamento superficial com mistura de ácido

As amostras de titânio grau 2, previamente confeccionadas, foram lixadas com lixas da ordem de granulometria: 400, 600 e 1200 grãos/pol², seguido de lavagem com água. Após a lavagem as amostras foram secas a 40ºC em uma estufa por 24 horas.

Tratamento superficial com mistura de ácido

Posteriormente as amostras foram tratadas com misturas de ácidos clorídrico/sulfúrico num tempo de 30 minutos, em diferentes concentrações, sendo estas 5% / 10%; 10% / 20% e 20% / 30% (v/v) para os respectivos ácidos (HCl / H₂SO₄).

Tratamento superficial com mistura de ácido

Após o ataque ácido as amostras foram analisadas quanto à rugosidade a partir das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e cultura de células, comparando com uma placa sem tratamento.

Cultura de células

Este ensaio foi realizado com células de Fibroblastos humanos da linhagem GMO7492, sendo cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em garrafas de cultivo de 50ml, a qual permaneceram incubadas em estufa de cultivo celular (37° C e 5%CO₂).

Cultura de células

Após a atingir a confluência de aproximadamente 80% a células foram desaderidas por meio de incubação com solução de tripsina (3% em PBS 1X). Em seguida o número total de células foi obtido utilizando um contador de células (Counter Cell, BioRad, USA).

Cultura de células

Foi realizado um ensaio de viabilidade e adesão celular por meio do ensaio de fluorescência utilizando o reagente Rezazurina resazurina (7-hidroxi-3Hfenoxazina-3-ona-10-óxido). Inicialmente as peças de titânio com diferentes tratamentos foram lavadas com solução de alcool 70% e esterilizadas por meio de irradiação UV por 3 horas.

Cultura de células

Após a esterilização foram semeadas 1x10⁵ células por poço em triplicata ,em placa de 24 poços. As células foram cultivadas por 24 horas para permitir a adesão. No dia seguinte as peças foram removidas para um novo poço e permaneceram incubadas por 4 horas em solução estéril de Rezazurina 10x.

Cultura de células

Após a incubação com a Rezazurina foi retirado um volume de 200ul (**To**) para a leitura da fluorescência (544nm excitações 590nm emissão) em leitor de placa Spectra Max Gemini XS (Molecular Devices). O restante do alamar foi descartado e adicionou-se o meio de cultura novamente.

MATERIAIS E MÉTODOS Cultura de células

As células permaneceram em cultivo por mais 24 horas, sendo o processo acima repetido para nova leitura da fluorescência (T24) A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3ona-10-óxido) é oxidada na presença de células viáveis à resofurina, facilitando a verificação da adesão e proliferação. Os valores médios obtidos de cada amostra foram comparados com os valores médios obtidos da solução de Resazurina sem a presença de células.

Resultado do DRX da amostra de confeccionada



Fonte: Autor, 2017.

DRX

De acordo com os resultados de difratometria de raios X, verificou-se a presença das fases α e α' na amostra confeccionada.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Placa não atacada com mistura de ácidos O material apresenta grãos equiaxiais, indicando que este está recristalizado, como observado nas figuras com aumento de 500x, 1000x e 2000x abaixo e demarcado na figura com aproximação de 5000x

Microscopia eletrônica de varredura da amostra não atacada com aumento de

500X



Fonte: Autor, 2017

Microscopia eletrônica de varredura da amostra não atacada com aumento

1000X



Microscopia eletrônica de varredura da amostra não atacada com aumento

2000X



Microscopia eletrônica de varredura da amostra não atacada com aumento



Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Placa atacada com mistura de ácidos Ataque HCl / $H_2SO_4 - 5\% : 10\% (v/v)$

Foi observado um aumento do aparecimento de pequenas cavidades em todo material, sendo possível uma melhor visualização na aproximação de 2000x, conservando as propriedades físicas do material, por ser o mesmo, como seus grãos equiaxiais, indicando que este está recristalizado.

Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / $H_2SO_4 - 5\%:10\%$ (v/v) com aumento de 500x



Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / $H_2SO_4 - 5\%:10\%$ (v/v) com aumento de 1000x



Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / $H_2SO_4 - 5\%:10\% (v/v)$ com aumento de 2000x



Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / H₂SO₄ - 5%:10% (v/v) c com aumento de 5000x



RESULTADOS E DISCUSSÃO Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Placa atacada com mistura de ácidos Ataque HCl / $H_2SO_4 - 10\% : 20\% (v/v)$

Foi observado um crescimento das cavidades em todo material em relação à imersão na mistura de ácidos menos concentrada, sendo possível uma melhor visualização na aproximação de 1000x.

A placa apresenta grãos equiaxiais, indicando recristalização, pois se trata da mesma amostra já estudada.

Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / H₂SO₄ - 10%:20% (v/v) com aumento de 500x



Fonte: Autor, 2017

Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / H₂SO₄ - 10%:20% (v/v) com aumento de 1000x



Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / H_2SO_4 – 10%:20% (v/v) com aumento de 2000x



Fonte: Autor, 2017

Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / H_2SO_4 – 10%:20% (v/v) com aumento de 5000x



RESULTADOS E DISCUSSÃO Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Placa atacada com mistura de ácidos Ataque HCl / $H_2SO_4 - 20\% : 30\% (v/v)$

Na aproximação de 1000x foi possível observar um grande aumento nas cavidades presentes no material comparado à imersão na mistura de ácidos de concentração intermediária $(10\% \text{ HCl} / 20\% \text{ H}_2\text{SO}_4)$.

Por se tratar do mesmo material, esta amostra também apresentou grãos equiaxiais, indicando recristalização.

Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / H₂SO₄ - 20%:30% (v/v) com aumento de 500x



Fonte: Autor, 2017

Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / H₂SO₄ - 20%:30% (v/v) com aumento de 1000x



Fonte: Autor,2017

Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / H₂SO₄ - 20%:30% (v/v) com aumento de 2000x



44

Microscopia eletrônica de varredura da amostra atacada com mistura de ácidos HCl / H_2SO_4 – 20%:30% (v/v) com aumento de 5000x



Fonte: Autor, 2017

Cultura de células

De acordo com os valores obtidos pela média da fluorescência verificou-se que a superfície de Titânio da **Amostra 1** sugeriu uma melhor capacidade de adesão e proliferação celular.

Cultura de células

A amostra não atacada e as amostras 2 e 3 apresentaram valores próximos ao do controle, verificando, em relação às últimas que o tratamento de superfícies com ácidos pode sugerir uma influência no aumento na concentração dos mesmos em relação à proliferação e adesão celular.

Cultura de células

Capacidade de adesão e proliferação celular

	To hs (Fl=544nm/590nm)	T24hs (Fl=544nm/590nm)
Controle (sem células)	8,35 x10 ⁷	8,6 x 10 ⁷
Amostra o (sem ataque)	9,0 x10 ⁷	11 X10 ⁷
Amostra 1 (5% HCl / 10% H ₂ SO ₄)	6,6 x 10 ⁷	4,3 X 10 ⁷
Amostra 2 (10% HCl / 20% H ₂ SO ₄)	7,8x10 ⁷	8,2x10 ⁷
Amostra 3 (20% HCl / 30% H ₂ SO ₄)	7,7 X 10 ⁷	8,6 x 10 ⁷

Fonte: Autor, 2017

CONCLUSÃO

Com os resultados da caracterização microestrutural da placa de Ti foi possível observar que a microestrutura é composta por precipitações na fase α ' na matriz α . Além disso, observou-se que o material encontra-se na condição recristalizada, devido à presença de grãos equiaxiais.

Foi observado que na microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o aumento da concentração da mistura de ácidos houve um aumento na degradação da placa

CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados no cultivo de células, conclui-se que a amostra de concentração 5% HCl / 10% H_2SO_4 da mistura de ácidos possui uma degradação da placa capaz de gerar uma maior estimulação de proliferação celular.

POUILLEAU, J. et al. Struture and composition of passive titanium oxide films. materials science and engineering. v. 47, p. 235-243, 1997.

ÁLVARO B. CARDOSO, BELMIRO C. E. VASCONCELOS, DAVID M. DE OLIVEIRA Estudo comparativo da eminectomia e do uso de miniplaca na eminência articular para tratamento da luxação recidivante da articulação temporomandibular rev bras otorrinolaringol. v.71, n.1, 32-7, jan./fev. 2005.

CASTRO, C. H. S. ,et al. Fratura de miniplaca em tratamento de luxação de atm - que conduta tomar? arch health invest (2013) 2(5): 54-58.

VENANCIO, R. A., CAMPIRIS, C. M. Disfunções temporomandibulares: estudo dos procedimentos realizados por profissionais. Ver. Odontol. UNESP. São Paulo. 31(2): 191-203. 2002.

SUL, Y. T. et al. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. medical engineering & physics. v. 23, p. 329- 346, 2001.

BRAGA, F. J. C. Modificação de superfície empregando-se laser e recobrimento de implantes dentários de titânio com apatitas. araraquara. 2007. 158p. doutorado em química. unesp, brasil.

RAMANATHAN, LALGUDI V. Corrosão e seu controle. Editora hemus. são paulo, 1995. 337p.

FILHO, J. R. L. et al. Fixação interna rígida reabsorvível bioabsorbable internal fixation Rev. Cir. Traumat. Buco - Maxilo-Facial, v.2, n.2, p. 31-40, jul/dez - 2002. SCHULTZE, J. W. Stability, reactivity and breakdown of passive films. problems of recent and future research. electrochimica acta. v. 45, p. 2499- 2513, 2000. KIPALDI, D. V. et al., Effect of passivation and dry heatsterilization on surface energy and topography of unalloyed titanium implants. colloids and surfaces a. physicochemical and engineering aspects. v. 135, p. 89-101, 1998. SUH, J. Y. et al. Effect of hydrotermally treated anodic oxide films on osteoblast attachment and proliferation. biomaterials. v. 24, p. 347-335, 2003. ALENCAR, A. C. Estudo das modificações na superfície do Ti cp titânio comercialmente puro e da liga Ti-6Al-4V usados como biomateriais utilizando-se deposição por plasma spray. Araraquara. 2002. Doutorado em química. Unesp, Brasil.

PORTO, G. G. VASCONCELOS, B. C. E. Complicação no tratamento de luxação recidivante da articulação temporomandibular: relato de caso. Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac., Camaragibe v.10, n.1, p. 63-66, jan./mar. 2010.

CUNHA, A. Avaliação do crescimento ósseo em implantes de titânio revestidos por plasma spraying com diferentes interfaces metal – filme. porto alegre. 2008. mestrado em engenharia e tecnologia de materiais. pucrs, brasil.

YI, J. H. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. surface science. v. 600, p. 4613- 4621, 2006.

SANTOS, L. C. B. Avaliação do processo de tratamento de superfície de implantes em titânio. Recife. 2017. Doutorado em odontologia. Ufpe, Brasil.

CUNHA, A. et al. A surgical procedure using sheep as an animal model to evaluate osseointegration. revista de clínica e pesquisa odontológica / journal of dental clinics and research, v. 3, p. 59-62, 2007.

JUNIOR, E. S. Anodização de titânio comercialmente puro para aplicações biomédicas. rio de janeiro. 2005. 118p. mestrado em engenharia metalúrgica e materiais. ufrj, brasil.

BARROS, V. F. Comportamento Do Titanio Comercialmente Puro Obtidos Por Diferentes Processamentos Submetidos a Soluções Fluoretadas. Rio de Janeiro. 2009. Doutorado em odontologia. Centro Biomédico, Brasil.

BAUER, J. R.O. Propriedades mecânicas do titânio e da liga Ti-6Al-4V fundidos em diferentes ambientes. São Paulo. 2007. Doutorado em odontologia. USP, Brasil.

JEMAT, A. et al. Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. Artigo de revisão. BioMed Research International. Volume 2015, Article ID 791725, p. 1. 2015.

STEGUES, E. M. S. Tratamento de superfícies de implantes osseointegráveis em titânio: revisão da literatura. Porto Alegre. 2014. Especialização em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial. UFRS, Brasil.

XAVIER, S. P. Caracterização e avaliação da biocompatibilidade do titânio submetido a diferentes tratamentos de superfície. Araçatuba. 2002. Doutorado em Odontologia. UNESP, Brasil.

AGHELI, H. Nanostructure biointerfaces. materials science and engineering. v. 26, p. 911-917, 2006.

LIU, X. et al., Surface modification of titanium alloys, and related materials for biomedical applications. materials science and engineering. v. 47, p. 49-121.

ROBERTSON, D. S, The relationship of physical and chemical processes in bone and blood formation. Medical hypotheses. Vol. 61, p. 623-635, 2010.

KOJIMAI, A. N. et al. Efeito do Tratamento de Superfície do Titânio Comercialmente Puro na Resistência de União ao Cisalhamento. Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa, 9(1):113-117, jan./abr. 2009.

LEE, W. J. Oxide nanotube arrays fabricated by anodizing processes for advanced material application. current applied physics. v. 8, p. 818-821, 2008.

Metalografia de Ligas de Titânio Utilizadas em Implantes Cirurgicos.

FAVERANI, L. P. Estudo in vitro das alterações na superfície do titânio comercialmente puro e da liga de titânio ti -6al-4v submetida a diferentes tratamentos. Araçatuba. 2012. Mestrado em odontologia. UNESP, Brasil.

YI, J. H. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. surface science. v. 600, p. 4613- 4621, 2006.

PEREIRA et al. Remoção de miniplacas e parafusos na região bucomaxilo-facial: revisão de literatura. Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac., Camaragibe v.5, n.3, p. 17 - 26, julho/setembro 2005.

HALIM, N. F. et al. Influência da textura superficial dos implantes. Revista Odonto Ciência. Fac. Odonto/PUCRS, v. 22, n. 55, jan./mar. 2007.

JESUS, J. et al. Tratamento superficial de bioativação do titânio. Congresso Latino Americano de órgãos artificiais e biomateriais. Natal, RN. 2012.

KONATU, R. T. Avaliação do comportamento mecânico sob deformação da liga ti-30ta visando aplicações biomédicas. Guaratinguetá 2011. Graduação em Engenharia de Materiais. Universidade Estadual Paulista, Brasil.

JONES, F. H. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. v. 42, p. 75-205, 2001.

BRANDÃO, M. L. et al. Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica. Revisão de literatura. Caderno científico. Revista implantnews;7(1):95-10. 2010.

COUTINHO; M. P. Influência da morfologia da superfície na molhabilidade do titânio comercialmente puro. Rio de Janeiro. 2007. Mestrado em Ciências dos Materiais. Instituto Militar de Engenharia, Brasil.

AWS COMIMITTEE ON HIGH-ENERGY BEAM WELDING AND CUTTING (Eua). Recommended Practices for laser beam welding, Cutting, and drilling. C 7.2:1998 Florida, 1998.108 p.

OKESON, J. P. Fundamentos de oclusão e desordens temporomandibulares 2ed. são paulo: artes médicas, 1992.

SILVA, J. C. Estudo comparativo de superfícies de titânio utilizadas em implantes. Curitiba – PR. 2006. Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais.

FERRAZ, E. P. Superfícies de titânio modificadas por plasma: avaliação in vitro em cultura de células osteoblásticas. Mestrado de cirurgia e cirurgia buco-maxilo-facial. Faculdade de Odontolofia de Ribeirão Preto, USP. 2012.