

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Campus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Camila Lopes Scapin

DESENVOLVIMENTO DE SUPERFÍCIES ATIVAS NA LIGA Ti-15Mo PARA
APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL

Araraquara (SP)

2010

Camila Lopes Scapin

DESENVOLVIMENTO DE SUPERFÍCIES ATIVAS NA LIGA Ti-15Mo PARA
APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos à obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi

Co-orientador: Dr. Nilson T. C. Oliveira

Araraquara (SP)

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Scapin, Camila Lopes

S2863d Desenvolvimento de superfícies ativas na liga Ti-15Mo para
aplicação como biomaterial / Camila Lopes Scapin. –
Araraquara : [s.n], 2010
50 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Antonio Carlos Guastaldi

Co-orientador: Nilson Tadeu Camarinho Oliveira

1. Biomateriais. 2. Liga Ti-15Mo. 3. Superfícies ativas.

I. Título.

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Camila Lopes Scapin

Nome em citações bibliográficas: SCAPIN, C. L.

Sexo: Feminino

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Rua Francisco Degni, s/n , CEP 14800-900 - Araraquara, SP - Brasil

Formação acadêmica/Titulação

2008

Mestrado em andamento em Biotecnologia (Conceito CAPES 4) .

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Título: ESTUDO IN VITRO EMPREGANDO-SE CULTURA DE CÉLULAS SOBRE A SUPERFÍCIE DA LIGA Ti-15Mo COM E SEM MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR FEIXE DE LASER E RECOBRIMENTO COM APATITAS, Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi.

Palavras-chave: liga Ti-15Mo; modificação de superfície; recobrimento por apatitas; ligas de titânio; biomateriais.

Grande área: Engenharias / Área: Engenharia Biomédica / Subárea: Engenharia Médica / Especialidade: Biomateriais e Materiais Biocompatíveis.

Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Físico-Química / Especialidade: Eletroquímica.

2002 - 2006

Graduação em Odontologia .

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Brasil.

Publicações

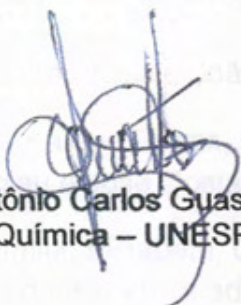
1. OLIVEIRA N.T.C.; PERROTTI V.; PALMIERI A.; GUASTALDI A.C.; PELLATI A.; SCAPIN C.L.; PIATTELLI A; CARINCI F. "In vitro analysis with human bone marrow stem cells on Ti-15Mo alloy for dental and orthopedic implants application" *Journal of Osseointegration*, **in press**, 2010.

CAMILA LOPES SCAPIN

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 22 de outubro de 2010.

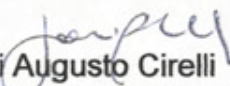
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Drª Carla dos Santos Riccardi
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli
Faculdade de Odontologia – UNESP, Araraquara

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi, pela orientação e conhecimentos adquiridos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jonni Augusto Cirelli, pela orientação, colaboração e conhecimentos adquiridos.

Ao Dr. Nilson Tadeu C. Oliveira, pela co-orientação, colaboração, conhecimentos adquiridos, amizade e realização deste trabalho.

Aos funcionários da Pós- Graduação pela paciência e ajuda prestada.

Aos amigos e colegas do departamento de Físico-Química: Carmen, Sebastião, Neide, Ricardo, Tarek, Rafael, Peter, Prof. Mário Cilense pela ajuda prestada, amizade e conhecimentos adquiridos.

Aos amigos e colegas do grupo de biomateriais: Anahí, Juliana, Regina, Carol, Eliana, Diego, Edson e Vinícius pela ajuda prestada, amizade e conhecimentos adquiridos.

Aos amigos Andressa e João pela ajuda na realização dos estudos *in vitro*.

Aos amigos Karen, Tereza, Camila, Daniella, Samuel, Vanessa, Silvia, Isadora, Maya, Nicolau e José Costa pela amizade, ajuda e compreensão.

A minha família: Elizabeth, Carina, Henrique, Beatriz, Irene, Lélia, Fábio e Billy pelos valores e conhecimentos adquiridos, amizade, carinho e apoio.

A CAPES pelo incentivo à pesquisa e realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro*, utilizando-se cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1, a interação da superfície da liga Ti-15Mo usinada, com irradiação por feixe de laser sem e com recobrimento de apatitas obtidas pelo método biomimético, empregando-se solução SBF(Simulated Body Fluid) padrão e SBF modificada. As superfícies obtidas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração de raios X (DRX), medidas de ângulo de contato e a camada de apatita foi avaliada também por Espectroscopia no Infra Vermelho Transformada de Fourier (FTIR). As avaliações *in vitro* foram realizadas utilizando as superfícies: usinada (U), modificada por feixe de laser (LA), modificada por laser e recoberta com SBF padrão (HA) e modificada por laser e recoberta com SBF modificada (AP). Os parâmetros biológicos avaliados foram: adesão, proliferação, contagem do número de células e conteúdo de proteína total. A morfologia celular, adesão e proliferação foram avaliadas por MEV, e a contagem de células utilizando-se hemocitômetro e azul de Tripán. Os estudos indicaram que o grupo AP apresentou os melhores resultados em relação à adesão, proliferação e contagem do número de células, seguido pelo grupo HA, LA e U respectivamente. Nas análises de conteúdo de proteína total, após 14 dias de cultura, o grupo LA obteve o melhor resultado, seguido por AP, HA e U respectivamente. Portanto, pode-se concluir que a modificação da superfície da liga Ti-15Mo por feixe de laser, seguida do emprego do método biomimético utilizando-se solução SBF modificada possibilitou a obtenção de condições biológicas favoráveis para aplicação desta liga como dispositivo ortopédico e odontológico.

Palavras-chave: Liga Ti-15Mo. Modificação de superfície. Recobrimento por apatitas. Ligas de titânio. Biomateriais.

ABSTRACT

The aim of this study was the *in vitro* evaluation of interaction surface, using cell culture osteoblastic MC3T3-E1, on Ti-15Mo alloy with machined surface, and with the surface modified by laser beam irradiation with and without coating of apatite obtained by biomimetic solution SBF (Simulated Body Fluid) standard and modified. The surfaces were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), measurements of contact angle and the layer of apatite was also evaluated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Evaluations were performed *in vitro* using the machined surfaces (U), modified by laser beam (LA), modified by laser and covered with standard SBF (HA) and modified by laser and covered with modified SBF (AP). The parameters evaluated were: adhesion, counting the number of cells and total protein content. Cell morphology, adhesion and proliferation were evaluated by SEM, and the cell count using hemocytometer and Trypan blue. The results indicated that the AP group showed better results of adhesion, proliferation and counting the number of cells, followed by the group HA, LA and U respectively. In the analysis of total protein content, after 14 days of culture, the LA group had the best result, followed by AP, HA and U respectively. Based on these results, it can be concluded that the modification on Ti-15Mo alloy using laser beam irradiation, followed by biomimetic method for surface coating using SBF modified solution showed favorable biological conditions for application and development of orthopedic and dental devices.

Key words: Ti-15Mo alloy. Surface modification. Apatite coating. Titanium alloys. Biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 - (a) Laser Ytterbium:YAG (b) Irradiação com feixe de laser.	19
FIGURA 4.1 - Liga Ti-15Mo com superfície lisa: (a) Micrografia MEV com ampliação 100x e (b) 500x; (c) EDS e (d) DRX.	25
FIGURA 4.2 - Liga Ti-15Mo com superfície tratada com laser: (a) Micrografia MEV com ampliação 100x e (b) 500x; (c) EDS e (d) DRX.	26
FIGURA 4.3 – Difrátograma (DRX) da liga Ti-15Mo, após modificação de superfície por feixe de Laser, ativação química com NaOH 5M.	27
FIGURA 4.4 - Micrografia da liga Ti-15Mo após modificação de superfície por feixe de Laser e ativação química com NaOH 5M, com ampliação (a) 100x. (b) 500x e (c) 1000x.	28
FIGURA 4.5 - Liga Ti-15Mo, após modificação de superfície por feixe de Laser, ativação química com NaOH 5M e deposição de Apatitas pelo método biomimético utilizando solução SBF padrão: (a) Micrografia MEV 500x; (b) Micrografia MEV 1000x; (c) EDS e (d) DRX.	30
FIGURA 4.6 - Liga Ti-15Mo, após modificação de superfície por feixe de Laser, ativação química com NaOH 5M e deposição de Apatitas utilizando solução SBF modificada: Micrografia MEV (a) 500x; (b) 1000x; (c) EDS.	31
FIGURA 4.7 - Liga Ti-15Mo, após modificação de superfície por feixe de Laser, ativação química com NaOH 5M e deposição de Apatitas pelo método biomimético utilizando solução SBF modificada: (a) DRX e (b) FT-IR.	32

FIGURA 4.8 - Grupo AP: mistura de fases correspondentes ao A - hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D) – $\text{Ca}_{9,04}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$ B – apatita carbonatada tipo B.	32
FIGURA 4.9 - Micrografia após 14 dias de cultura de células: (a) Grupo U, (b) Grupo LA, (c) Grupo HA e (d) Grupo AP.	36
FIGURA. 4.10 - Micrografia do Grupo U (a) antes e após (b) 24 h, (c) 7 dias e (d) 14 dias de cultura de células.	39
FIGURA 4.11 - Micrografia do Grupo LA (a) antes e após (b) 24 h, (c) 7 dias e (d) 14 dias de cultura de células.	40
FIGURA 4.12 - Micrografia do Grupo HA (a) antes e após (b) 24 h, (c) 7 dias e (d) 14 dias de cultura de células.	41
FIGURA 4.13 - Micrografia do Grupo AP (a) antes e após (b) 24 h, (c) 7 dias e (d) 14 dias de cultura de células.	42
FIGURA 4.14 - Variação do numero de células em função do período de cultura para os diferentes grupos analisados.	43
FIGURA 4.15 - Variação dos níveis de absorbância (conteúdo de proteína total) em função do período de cultura para os diferentes grupos analisados.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Concentrações iônicas das soluções SBF utilizadas (mmol.dm^{-3}).	20
Tabela 4.1 - Freqüências de absorção no IV características dos fosfatos de cálcio.	33

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
$\varnothing$	Diametro
μ	micro
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
Ca	Cálcio
DRX	Difratometria de raios X
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
EDS	Espectrometria de Energia Dispersiva
FTIR	Infra vermelho com transformada de Fourier
Grupo U	Liga Ti-15Mo usinada
Grupo LA	Liga Ti-15Mo irradiada por laser
Grupo HA	Liga Ti-15Mo irradiada por laser e recoberta por apatita (SBF padrão)
Grupo AP	Liga Ti-15Mo irradiada por laser e recoberta por apatita (SBF modificada)
HA	Hidroxiapatita
HAD	Hidroxiapatita deficiente em cálcio
MC3T3-E1	Linhagem comercial de células osteoblásticas utilizada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mo	Molibdênio
Nb	Nióbio
OCP	Fosfato octacálcico

P	Fósforo
PBS	Phosphate Buffered Saline
SBF	Simulated Body Fluid
Ta	Tântalo
TCP	Fosfato tricálcico
Ti	Titânio
Ticp	Titânio comercialmente puro
XRF	Fluorescência de raios X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Obtenção da Liga	18
3.2. Tipos de Superfície	18
3.3. Caracterização das Superfícies	20
3.4. Estudos <i>in vitro</i> : Cultura de Células osteoblásticas MC3T3-E1	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Modificação de superfície por feixe de laser	24
4.2 Recobrimentos Bioativos	26
4.3 Medida de ângulo de contato	33
4.4 Cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1	35
4.4.1 Morfologia Celular	35
4.4.2 Adesão e Proliferação	37
4.4.3 Contagem de células	43
4.4.4 Conteúdo de proteína total	44
5 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Grande interesse tem sido empregado para o desenvolvimento de uma nova geração de materiais biocompatíveis e resistentes ao desgaste e à corrosão (NINOMI et al, 1999). Pesquisas em muitos biomateriais são feitas visando ligas de Titânio tipo β , porque algumas variáveis do processo podem ser melhor controladas visando a obtenção de propriedades mecânicas desejadas, como por exemplo, baixo módulo de elasticidade, aumento na resistência à corrosão e melhora na resposta com tecidos são obtidas mais facilmente quando comparadas com ligas do tipo $\alpha+\beta$ (KURODA et al., 1995). Com isso, estão sendo desenvolvidas ligas de Ti do tipo β , apresentando baixo módulo de elasticidade, alta resistência mecânica, biocompatibilidade, além de serem compostas de elementos não tóxicos tais como Nb, Ta, Mo (ZARDIACKAS; DARREL; MITCHEIL, 1997; NINOMI et al, 1999).

As ligas Ti-Mo têm sido objeto de diferentes estudos microestruturais (SUGANO et al., 1998; GUO et al., 2000; GUO; ENOMOTO, 2002; SUKEDAI et al., 2003; LIU et al., 2003) e eletroquímicos (WANG et al., 1997; SAKAGUCHI et al., 1999; HABAZAKI et al., 2003B; POPA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA; GUASTALDI, 2008; OLIVEIRA; GUASTALDI, 2009). Estudos prévios mostraram que a estrutura cristalina das ligas é sensível à concentração de Mo; a fase α'' é observada quase que exclusivamente quando a concentração de Mo adicionada ao Ticp atinge 6%. Uma retenção significativa da fase β é observada para a liga contendo 10% de Mo, enquanto que para concentrações mais elevadas de Mo (15 e 20%) é observada somente a retenção da fase β (OLIVEIRA et al., 2007). Em outro trabalho (OLIVEIRA; GUASTALDI, 2008), são relatados estudos eletroquímicos realizados nas ligas de Ti-Mo na estrutura bruta de fusão (4 a 20 %m Mo), em Na_2SO_4 e solução fisiológica de Ringer. Os resultados mostraram que as ligas apresentam passivação espontânea em 1 hora de imersão, e não apresentam corrosão por pites até potenciais de até 8V (ECS),

indicando alta resistência à corrosão para as amostras. Estes resultados mostram claramente que acrescentando Mo ao Ti cp a estabilidade dos óxidos anódicos é melhorada (OLIVEIRA; GUASTALDI, 2008).

É conhecido que a resposta biológica e o sucesso do implante depende das propriedades físico-químicas da superfície. Assim, torna-se necessária a utilização de métodos de modificação de superfície para melhorar a atividade biológica destes materiais e favorecer a formação óssea (ELLINGSEN, 2003).

Com o surgimento de novas ligas metálicas e processos de aprimoramento dos materiais, como as modificações de superfície e recobrimentos biocerâmicos, os biomateriais tornaram-se mais aptos às respostas biológicas favoráveis, executando o seu papel de substituir órgãos ou parte deles, em relação à estética e função, em similaridade com o organismo.

Dentre os vários processos de modificação de superfície, o feixe de laser tem sido citado como uma excelente ferramenta modificadora de superfície, além de apresentar um processo livre de contaminações e altamente reprodutível.

Muitos fatores podem influenciar o processo de modificação de superfície, tais como fatores de energia (potência do laser, velocidade de varredura do laser, coeficiente de absorção, etc), fatores geométricos (espessura e largura do material), e parâmetros de propriedades dos materiais (térmicos, físicos e mecânicos) (YANJIN et al., 2004).

A energia do feixe de laser transferida para a superfície do titânio durante o processo apresenta intensidade e fluência controláveis. Cada condição paramétrica estabelecida produz uma superfície química e morfologicamente diferente. A interação feixe de laser-titânio conduz a efeitos térmicos durante a sequência de pulsos, e a superfície pode se fundir e até vaporizar criando um estado de plasma, denominado fenômeno de ablação, caracterizado pela ocorrência de transporte de energia e massa de local para local na superfície irradiada (HALLGREN et al., 2003; SETO et al., 2001; ULLMANN et al., 2002). O resultado do processo provoca a difusão de átomos para o titânio próximo à área irradiada, especialmente: oxigênio e nitrogênio presentes na atmosfera ambiente. Os processos de fusão e solidificação rápidos levam a um estado de não-equilíbrio com as reações químicas ocorrendo fora do equilíbrio termodinâmico,

as quais dependem da temperatura e de outros fatores como comprimento de onda, intensidade, polarização, tempo de irradiação e atmosfera (BRAGA, 2007).

As biocerâmicas de fosfato de cálcio têm sido amplamente utilizadas em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas, como recobrimentos ou materiais densos para a reposição e reparação do tecido ósseo; e a hidroxiapatita, por constituir o principal componente mineral dos ossos, é o fosfato de cálcio mais amplamente utilizado como biocerâmica, entretanto, além da hidroxiapatita, vários outros fosfatos de cálcio também ocorrem em calcificações normais e patológicas, o que vem despertando interesse significativo nas possibilidades de uso destes materiais como biocerâmicas (KAWACHI et al., 2000; CAMPBELL, 2003).

Desde a sua primeira formulação, o Método Biomimético sofreu significantes variações, visando acelerar o processo de deposição e alterar a cristalinidade do recobrimento, incluindo pré-tratamentos do substrato e a utilização de soluções com concentração variada. Outra alteração consistiu na modificação da composição da solução biomimética, com o objetivo de possibilitar a obtenção de diferentes fases de apatitas. O método foi inicialmente desenvolvido com o propósito de se obter no recobrimento somente a hidroxiapatita, entretanto, com o crescente interesse na utilização de outros fosfatos de cálcio como recobrimento, foram desenvolvidas soluções biomiméticas, as quais foram denominadas de SBF modificadas, possibilitando a obtenção das diferentes fases de apatita de importância biológica e o planejamento da composição do recobrimento de acordo com a solução utilizada (APARECIDA, 2006).

A partir do reconhecimento da limitação de seu uso clínico, devido à sua lenta biodegradação, outros fosfatos de cálcio passaram a despertar interesse na utilização como biomateriais, tais como, ACP, OCP e TCP. A maior solubilidade destas fases de apatita faz com que suas propriedades físico-químicas e biológicas superem as da HA, guiando o cenário atual para a classificação destes materiais como substitutos ósseos mais adequados que a HA em aplicações onde se requer rápida formação óssea (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Novos materiais devem ser desenvolvidos não apenas estimulando uma resposta bioquímica do tecido vivo para obter uma forte ligação, mas também facilitando a

regeneração dos tecidos calcificados, em vez de substituí-lo. Em primeiro lugar, eles devem ser capazes de agir como um substrato de suporte à proliferação celular óssea e promover a atividade osteogênica. Em segundo lugar, estes materiais devem ser suscetível à degradação osteoclástica, para que se tornem completamente substituídos por novo osso funcional (HENCH, 2005).

As avaliações biológicas iniciais dos biomateriais pelo método *in vitro* podem apresentar uma rápida resposta. Em ambiente desfavorável, as células facilmente sofrem lise, o que sugere um biomaterial não ser adequado do ponto de vista celular. Diversos elementos liberados pelos biomateriais ao longo do tempo também podem induzir uma má resposta celular. Para se induzir a diferenciação em tecido ósseo é necessário que toda a cadeia de reações bioquímicas ocorra na faixa de tolerância vital da cultura em questão. O custo experimental é reduzido e existe um bom controle de variáveis no sistema *in vitro* em comparação ao método *in vivo* (HACKING et al., 2008).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar modificações de superfície na liga Ti-15Mo empregando-se feixe de laser e recobrimento com apatitas e análises *in vitro* de culturas de células osteoblásticas, de linhagem comercial MC3T3-E1, a fim de se avaliar parâmetros como adesão celular, proliferação celular e conteúdo de proteína total, visando o aprimoramento e o desenvolvimento da liga Ti-15Mo para a aplicação biomédica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da Liga

A liga Ti-15Mo (m/m) estudada neste trabalho foi fundida no Laboratório de Metalurgia Física e Solidificação, da Faculdade de Engenharia Mecânica - UNICAMP, pelo pós doutorando Nilson T.C. Oliveira, durante seu pós doutoramento junto ao Grupo de Biomateriais, utilizando um procedimento já descrito na literatura (OLIVEIRA et al., 2004 e 2007). Após a fusão, a composição, morfologia e a estrutura da liga foram caracterizadas por diferentes técnicas: Espectrometria de Energia Dispersiva (EDS); Fluorescência de raios X (XRF); Metalografia; Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Mapeamento Elementar e Difractometria de raios X (DRX) (OLIVEIRA et al., 2007 e 2008). Estas análises não serão discutidas neste trabalho.

3.2 Tipos de superfície

Os lingotes obtidos após a fusão foram usinados na forma de cilindros com 10,0mm de diâmetro, dos quais foram cortados discos com 2,0 mm de espessura. As superfícies dos discos foram preparadas como descrito a seguir:

A- Liga Ti-15Mo polida – Grupo U

B- Liga Ti-15Mo irradiada por laser – Grupo LA

C- Liga Ti-15Mo irradiada por laser e recoberta por apatita (SBF convencional) – Grupo HA

D- Liga Ti-15Mo irradiada por laser e recoberta por apatita (SBF modificada) – Grupo AP

➤ Preparo das amostras por laser

Os discos da liga Ti-15Mo foram irradiados por feixe de laser em condições de ajuste pré estabelecida; laser na potência 140 W e frequência 20 Hz. Para esta finalidade foi utilizado o aparelho de laser Yb pulsado (DML-100, Violin Sistema Omnimark - Laser, Fibra Óptica - Yb pulsado, 20W) – Fig. 3.1.

Após o procedimento de aplicação do laser, as amostras foram limpas com banho de 15 minutos em acetona e álcool no ultra-som e depois em banho de 15 minutos em água deionizada também no ultra-som.

Posteriormente, as amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, EDS, DRX e FT-IR, em seguida, foram esterilizadas por radiação gama para utilização na fase de cultura celular.

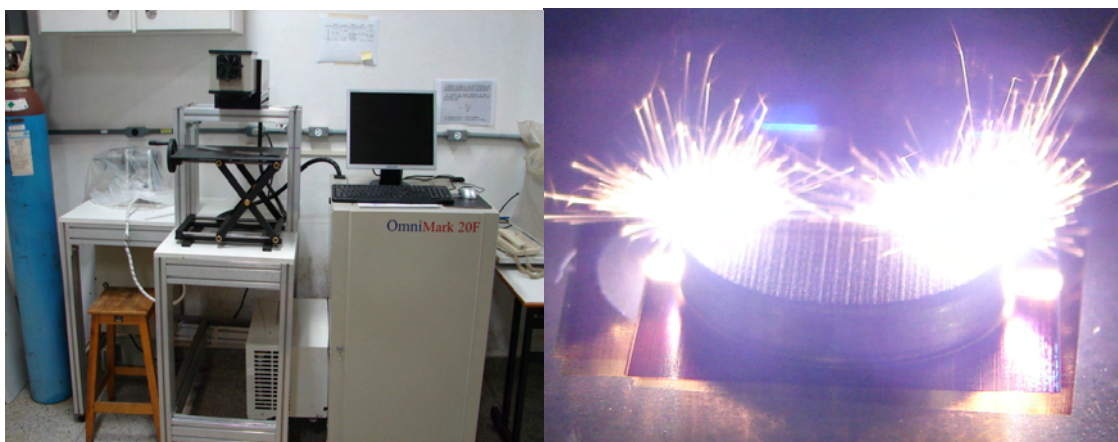


FIGURA 3.1 – (a) Laser Ytterbium:YAG (b) Irradiação com feixe de laser.

➤ Recobrimento com apatitas

Nesta etapa utilizou-se o processo de deposição biomimética que é baseado na precipitação heterogênea sobre substratos de titânio ativados (KOKUBO, 1998). A superfície da liga foi previamente tratada em uma solução alcalina, NaOH 5M, a temperatura de 60°C (em estufa) por 24 horas. Essas amostras foram lavadas com água deionizada, secas em temperatura ambiente e depois retornaram à estufa (60°C)

por um período de 3 horas, ativando a superfície do metal. Para a nucleação e crescimento do recobrimento de apatita as amostras foram imersas em 2 soluções SBF: a solução SBF convencional do método biomimético (ABE; KOKUBO; YAMAMURO, 1990) e SBF modificada – SBF desenvolvida por Aparecida (2006). A composição dessas soluções é apresentada na tabela 3.1. As amostras foram mantidas nas soluções SBF convencional e SBF modificada a 37°C durante 4 dias, objetivando a obtenção de um recobrimento bioativo.

Tabela 3.1: Concentrações iônicas das soluções SBF utilizadas (mmol.dm⁻³).

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
Plasma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	1,0	0,5	27,0
SBF (convencional)	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	1,0	0,5	4,2
SBF (modificada)	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	-	5,0

3.3 Caracterização das superfícies

➤ Microscopia Eletronica de Varredura – MEV/ EDS

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de estudar a morfologia da superfície, homogeneidade e análise dos materiais em diferentes fases de preparo das amostras e adesão e proliferação celular. O Equipamento utilizado foi um Microscópio Digital Scanning Microscope Zeiss, modelo DSM 960 – Departamento de Engenharia de Materiais – UFSCar – São Carlos, acoplado a um analisador dispersivo de energia de Si(Li) com janela de Be, modelo 760 e resolução de 133eV espectroscópica por energia dispersiva – EDS.

➤ Difractometria de raios X – DRX

Esta técnica foi utilizada para a identificação das fases ou estruturas cristalográficas ocorridas na liga Ti-15Mo com modificação de superfície e recobrimento por apatitas e variação das concentrações dos seus elementos constituintes.

Para a identificação das fases presentes nas ligas Ti-15Mo com estrutura bruta de fusão foi utilizado um difratômetro de raios X Rigaku RINT 2000, com varredura angular entre 20° e 80°, utilizando-se radiação de Cu ($K\alpha_1$) – Instituto de Química – UNESP/Araraquara.

➤ Espectroscopia no infravermelho – FTIR

Esta técnica detecta as frequências das vibrações das ligações químicas no sólido dando informações complementares às obtidas por difração de raios X. A técnica é importante para detecção de fases adicionais, indicação de cristalinidades dos recobrimentos por apatitas. O equipamento utilizado foi Perkin Elmer FTIR Spectrometer modelo Spectrum 2000, com a análise feita por reflectância, do Instituto de Química – UNESP/Araraquara.

➤ Medida de Ângulo de Contato

Discos ($\varnothing$ 10mm x 2 mm espessura) da liga Ti-15Mo, com superfície dos grupos U, LA, HA, e AP foram utilizados para medidas de ângulo de contato (OCA-15 Video-Based Optical Contact Angle Meter, Dataphysics) Instituto de Química – UNESP/Araraquara, usando água desmineralizada como líquido de análise.

Nestes estudos, no mínimo 3 gotas foram colocadas em diferentes partes da superfície das amostras. Após a preparação da superfície, as amostras foram limpas em banho de etanol com ultrassom. Para reduzir o efeito da umidade atmosférica nos discos, especialmente nas amostras tratadas com Laser, todas as medidas de ângulo de contato foram realizadas no máximo após 1h do tratamento. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente.

3.4 Estudos *in vitro*: Cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1

Células MC3T3-E1 de camundongos obtidas comercialmente foram descongeladas e cultivadas em Meio Essencial Mínimo - Alfa com L-glutamina (α -MEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen), 1% penicilina/estreptomicina, 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma) e 7mM de ácido β -glicerofosfórico (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até atingirem 70-80% de confluência. Os discos da liga Ti-15Mo teste e controle foram colocados em placas de 24 poços e sobre eles foram pipetados 150 μ L de meio de cultura contendo 1x10³ células. Após incubação por 4 horas, foi acrescentado meio de cultura para completar 1,5 mL por poço. Após períodos pré-definidos, as amostras foram coletadas para análises de adesão e proliferação celular em microscopia eletrônica, contagem total de células viáveis e quantificação de proteína total no lisado celular.

➤ Adesão e proliferação celular

Preparo de amostras para microscopia eletrônica de varredura

Para as análises de adesão e proliferação celular foram utilizadas amostras nos períodos de 24h (adesão), 7 e 14 dias (proliferação). O meio de cultura foi aspirado e as amostras foram lavadas com PBS. Em seguida, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em PBS por 30 minutos e lavadas com PBS por 3 vezes durante 5 minutos cada. Após a lavagem, foi feita desidratação em série crescente de álcool etílico (25%, 50%, 75%, 95% e 100%) durante 5 minutos em cada solução. Finalmente, as amostras foram secadas em dessecador a vácuo por 15 minutos. Após a deposição de ouro para a visualização das amostras em MEV, foram selecionados e fotografados aleatoriamente 6 campos de cada amostra, para posterior análise qualitativa descritiva.

➤ **Contagem de células**

Amostras nos períodos de 5 e 10 dias tiveram suas células enzimaticamente destacadas das superfícies da liga por ação de solução de tripsina 0,25% (Gibco, Invitrogen). O número de células viáveis foi contado por meio de hemocitômetro, após a marcação com azul de Tripan (Sigma). Para cada período foi determinado o número total de células viáveis por poço.

➤ **Conteúdo de proteína total**

O conteúdo de proteína total foi determinado pelo método de Bradford (Bio-Rad). Inicialmente, proteínas foram extraídas de cada poço com lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma) por 40 min. A leitura de absorbância a 595 nm foi realizada em leitor de Elisa ELx 800 (Bio-Tek).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.1 Modificação de superfície por feixe de laser

As Figs. 4.1 e 4.2 apresentam, respectivamente, a superfície das amostras usinadas e irradiada por feixe de Laser. As amostras usinadas apresentaram uma superfície lisa (Fig. 4.1a e b), enquanto que as tratadas apresentaram topografia irregular em sua superfície (Fig. 4.2a e b).

Análises por EDS indicaram que as amostras usinadas apresentam somente os elementos constituintes da liga, Ti e Mo, enquanto que nas amostras irradiadas por Laser estava presente também oxigênio (Fig. 4.2c). Isto se deve ao fato de que no método de modificação por feixe de Laser ocorre a fusão e solidificação rápida do Ti em atmosfera ambiente (isto é, em presença de O_2). Nenhum elemento não constituinte da liga foi identificado, confirmando a ausência de contaminação da superfície pelo método de irradiação por Laser.

Os resultados obtidos em estudos anteriores (OLIVEIRA, 2007) mostraram que a estrutura cristalina das ligas binárias Ti-Mo é sensível à concentração de molibdênio na liga, sendo que a liga com 15 % de Mo (m/m) apresenta apenas a fase β , semelhante ao obtido no presente estudo. Comparando-se os resultados obtidos para a liga Ti-15Mo com as diferentes superfícies, pode-se observar que no grupo U encontra-se apenas a fase β (Fig. 4.1d), enquanto que nas amostras tratadas por feixe de laser foi verificada também a presença do TiO_2 (Fig. 4.2d). Esta constatação é de grande relevância, tendo em vista que vários estudos têm relatado que a maior bioatividade do titânio após o tratamento de superfície é devido à presença da camada de TiO_2 , a qual favorece a formação de apatitas após imersão em SBF (LIN; YEN, 2006, APARECIDA 2006).

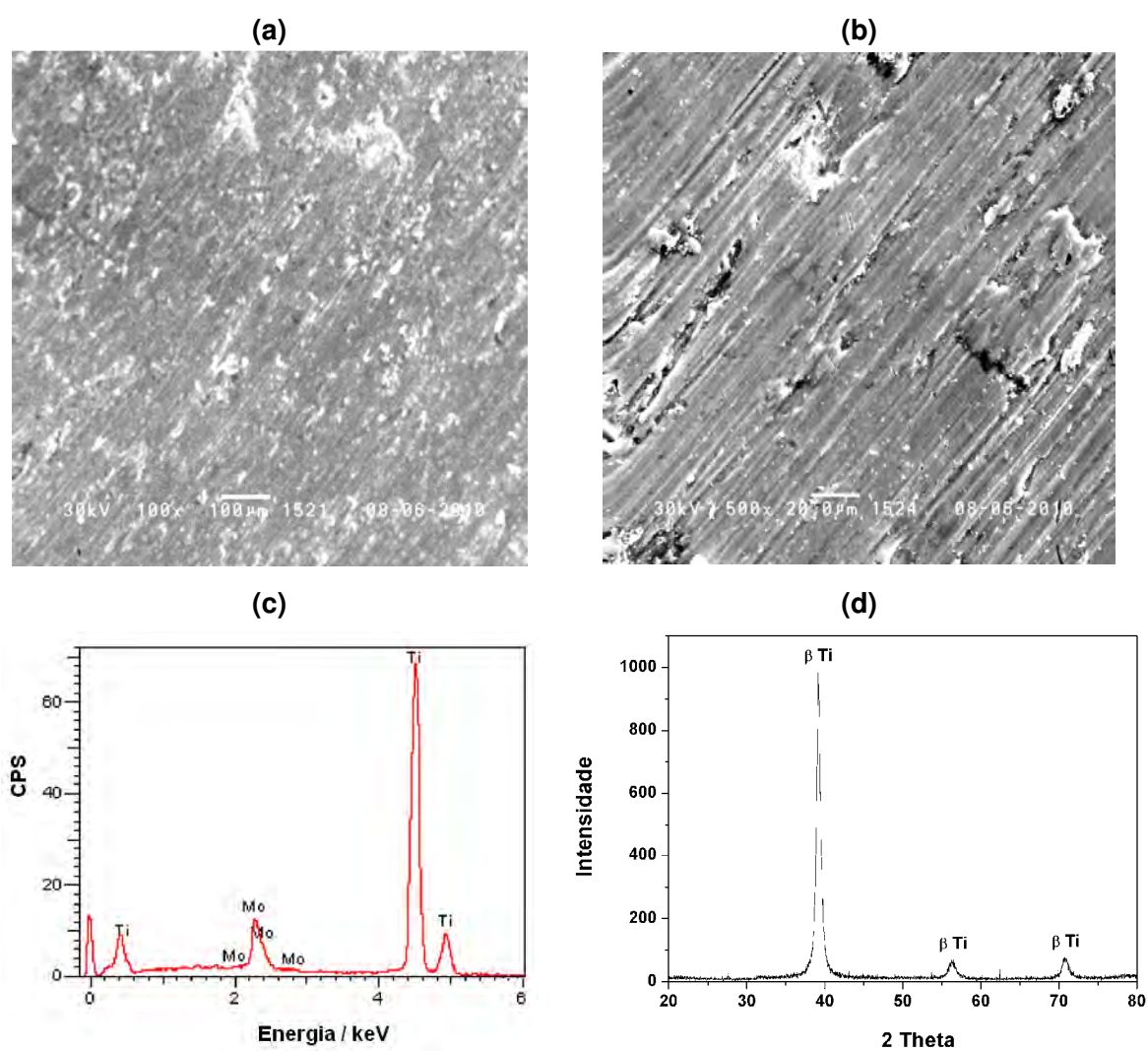


FIGURA 4.1: Liga Ti-15Mo com superfície usinada: (a) Micrografia MEV com ampliação 100x e (b) 500x; (c) EDS e (d) DRX.

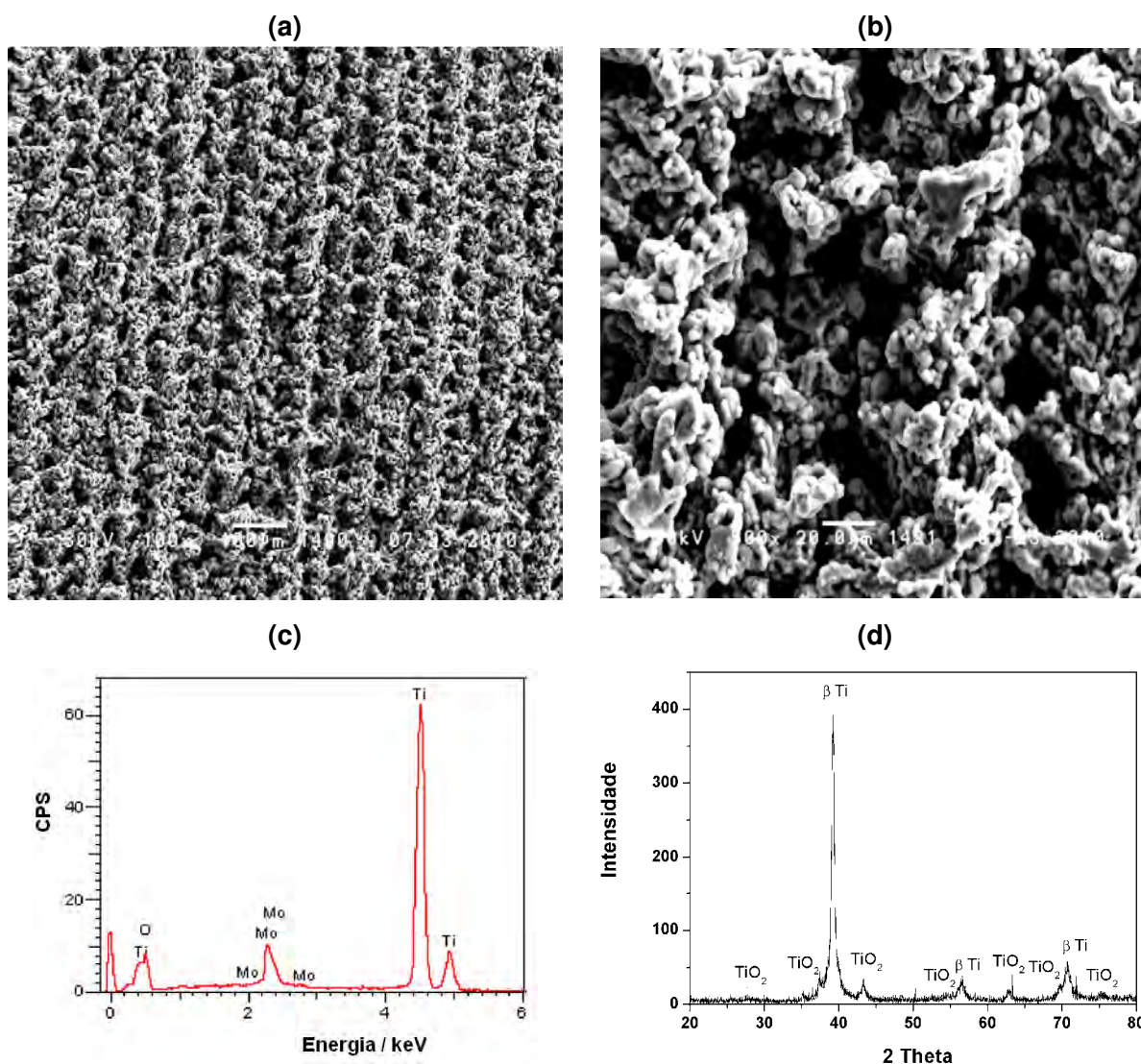


FIGURA 4.2: Liga Ti-15Mo com superfície tratada com laser: (a) Micrografia MEV com ampliação 100x e (b) 500x; (c) EDS e (d) DRX.

4.2 Recobrimentos Bioativos

As apatitas, ou fosfatos de cálcio, apresentam-se hoje como um dos principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados; biocompatibilidade adequada; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

➤ Deposição de apatitas

Após a modificação da superfície da liga e ativação química com NaOH 5 M e tratamentos térmicos, verificou-se a formação de uma camada de hidrogel de titanato de sódio, tornando a superfície do metal termodinamicamente estável e com atividade iônica adequada para induzir a deposição do filme biocerâmico.

Nas Figs. 4.3 e 4.4 são apresentadas caracterizações da superfície da liga Ti-15Mo empregando-se análise por DRX e MEV respectivamente. Após tratamento alcalino com solução de NaOH 5M e posterior tratamento térmico a 60°C/3h, observa-se pela análise por DRX (Fig. 4.3) a presença de titanato de sódio sobre a superfície da amostra. Na Fig. 4.4 são apresentadas micrografias da mesma superfície, com diferentes ampliações, onde pode-se observar a formação da camada de titanato de sódio.

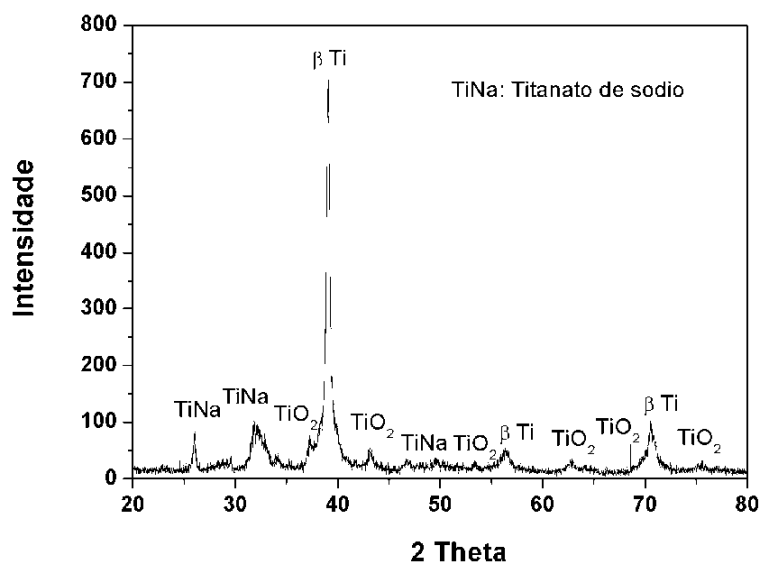


FIGURA 4.3: Difratograma (DRX) da liga Ti-15Mo, após modificação de superfície por feixe de Laser, ativação química com NaOH 5M.

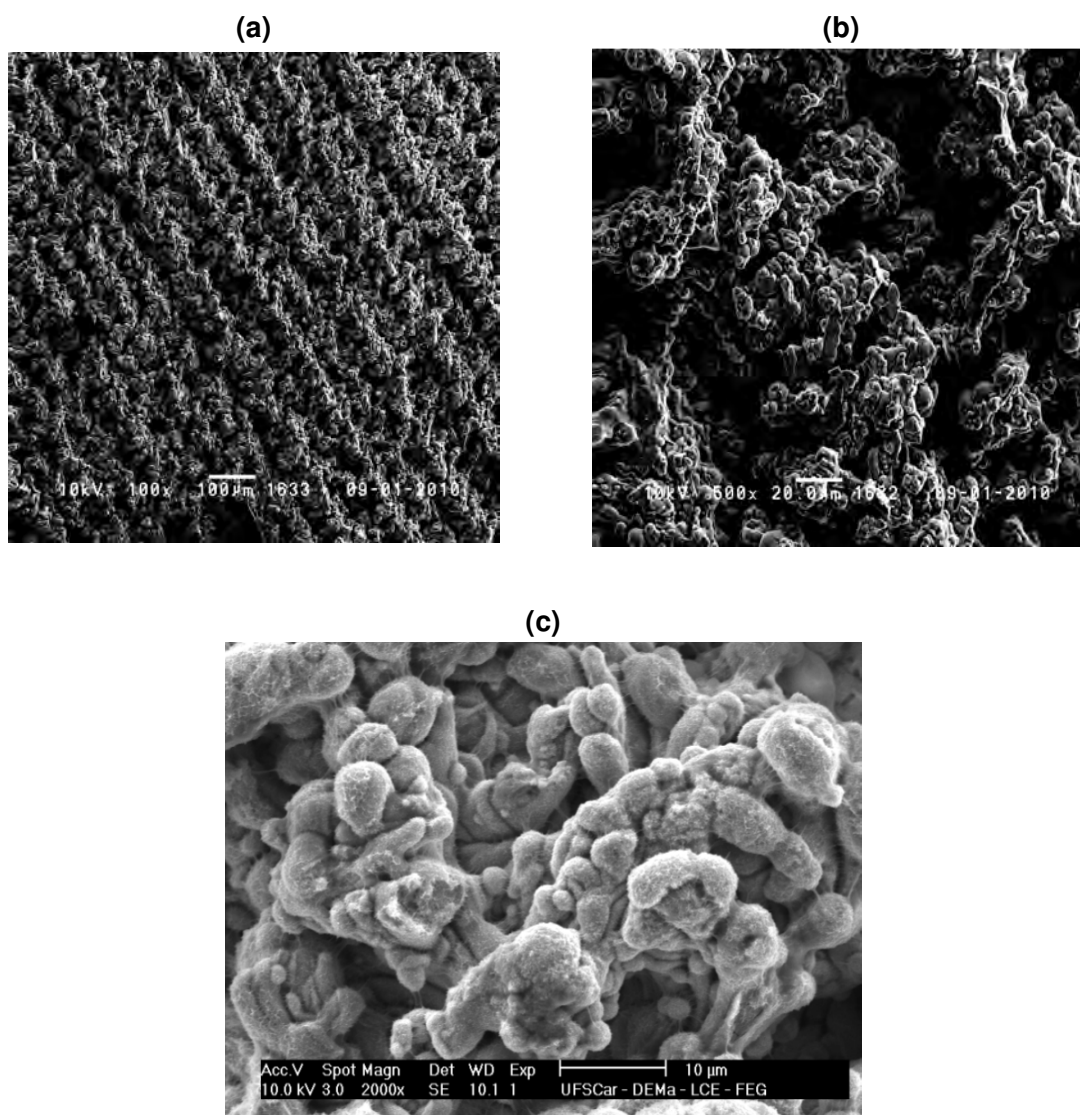
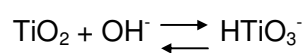
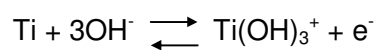


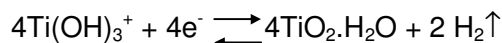
FIGURA 4.4: Micrografia da liga Ti-15Mo após modificação de superfície por feixe de Laser e ativação química com NaOH 5M, com ampliação (a) 100x. (b) 500x e (c) 2000x.

Durante o tratamento com solução alcalina, a camada de TiO_2 reage devido ao ataque químico do grupo OH^- , da seguinte forma (KOKUBO, 1998):

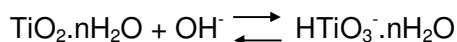


Esta reação ocorre simultaneamente com a hidratação da superfície da liga:

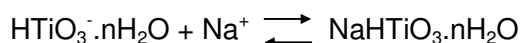




Um ataque adicional do grupo OH^- ao TiO_2 hidratado produz hidratos negativamente carregados sobre a superfície da liga:



Estas espécies carregadas negativamente combinam com os íons alcalinos da solução, resultando na formação de uma camada de hidrogel de titanato de sódio, que após tratamento térmico resulta em titanato de sódio amorfo (KOKUBO, 1998; VERCÍK et al., 2003; VERCÍK, 2004):



As Figs. 4.5 e 4.6 apresentam a superfície da liga Ti-15Mo modificada por feixe de laser após a imersão nas soluções SBF padrão e SBF modificada.

Pela análise da Fig. 4.5, observa-se que após 4 dias de imersão em SBF padrão nenhum recobrimento de apatita foi formado sobre a superfície da liga, estando presente a camada de titanato alcalino. O espectro de EDS (Fig. 4.5 c) confirma esse resultado, pois observa-se a presença do elemento Ca sem a presença do elemento P, indicando a ausência do recobrimento de apatita.

A caracterização por DRX (Fig. 4.5 d) confirmou que a superfície é composta somente por titanato de sódio, semelhante ao resultado apresentado para as amostras submetidas à ativação química da superfície previamente à deposição de apatitas (Fig. 4.3 e 4.4). Em virtude do não recobrimento do grupo HA, demonstrado por essas

análises, a análise por FTIR não foi realizada, tendo em vista que esta técnica é utilizada para a caracterização dos recobrimentos de apatita.

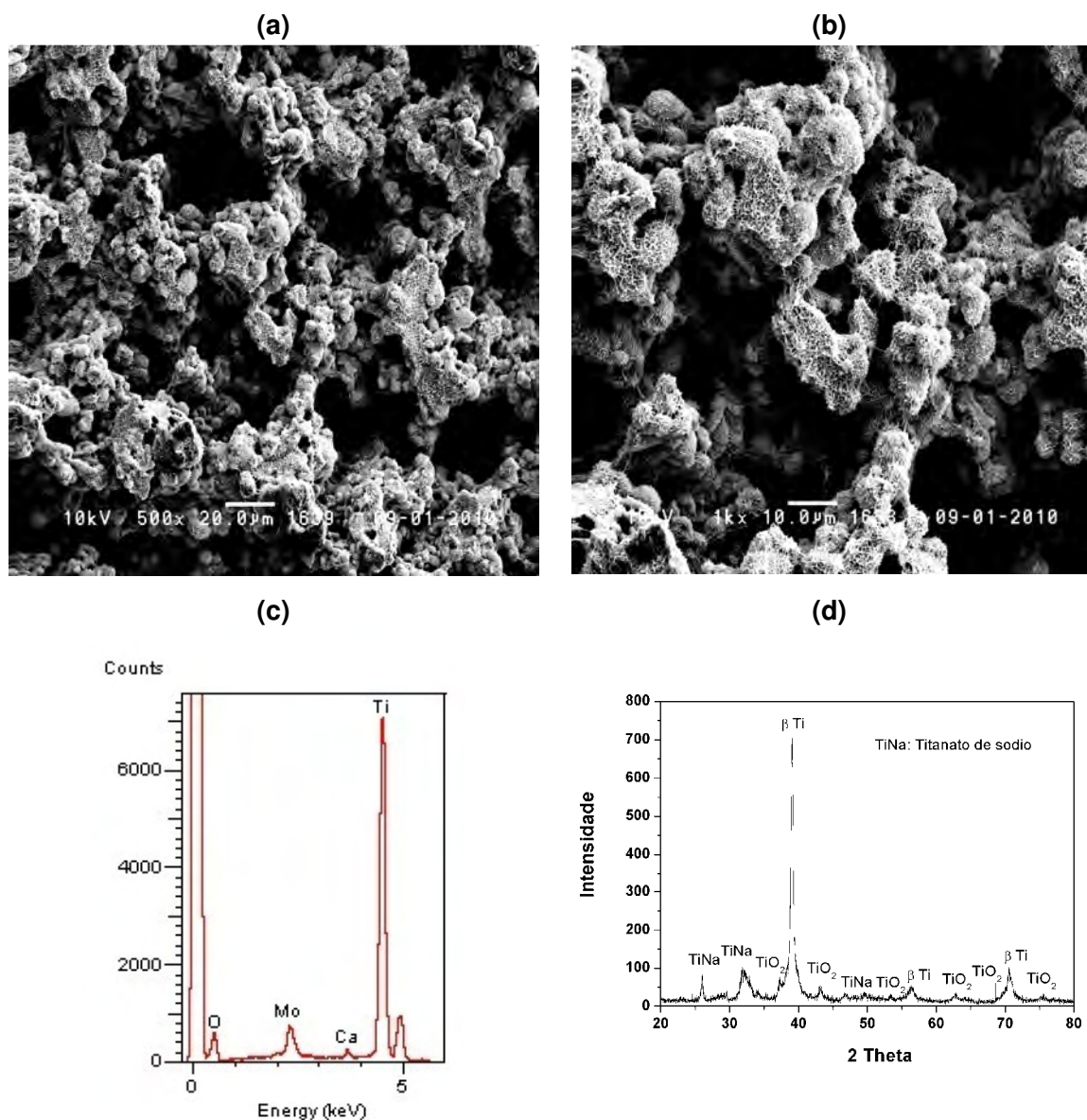


FIGURA 4.5: Liga Ti-15Mo, após modificação de superfície por feixe de Laser, ativação química com NaOH 5M e deposição de Apatitas pelo método biomimético utilizando solução SBF padrão: (a) Micrografia MEV 500x; (b) Micrografia MEV 1000x; (c) EDS e (d) DRX.

Após 4 dias de imersão em SBF modificada foi verificada a presença de recobrimentos compostos por partículas características de hidroxiapatita deficiente em

cálcio, as quais são descritas apresentando morfologia em forma de flor (APARECIDA, 2009). O espectro de EDS confirma a presença de recobrimento de apatita, pois exibiu além do pico referente ao elemento Ca, pico do elemento P, estando estes elementos presentes numa razão Ca/P 1,82 (Fig. 4.6 c).

Os resultados de DRX confirmaram as observações anteriores, pois apresentou picos característicos da hidroxiapatita deficiente em cálcio (HAD) – $\text{Ca}_{9,04}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$ e de apatita carbonatada B (Fig. 4.7a). As bandas exibidas por espectroscopia de IV (Fig. 4.7b) foram características dos grupos PO_4 (em 480, 527 e 562 cm^{-1}), P-OH (em 527 cm^{-1}) e apatita carbonatada do tipo B (em 1468 cm^{-1}) (Tab. 4.1), confirmando uma mistura de fases relativas à hidroxiapatita deficiente em cálcio HAD e apatita carbonatada do tipo B (Fig. 4.8).

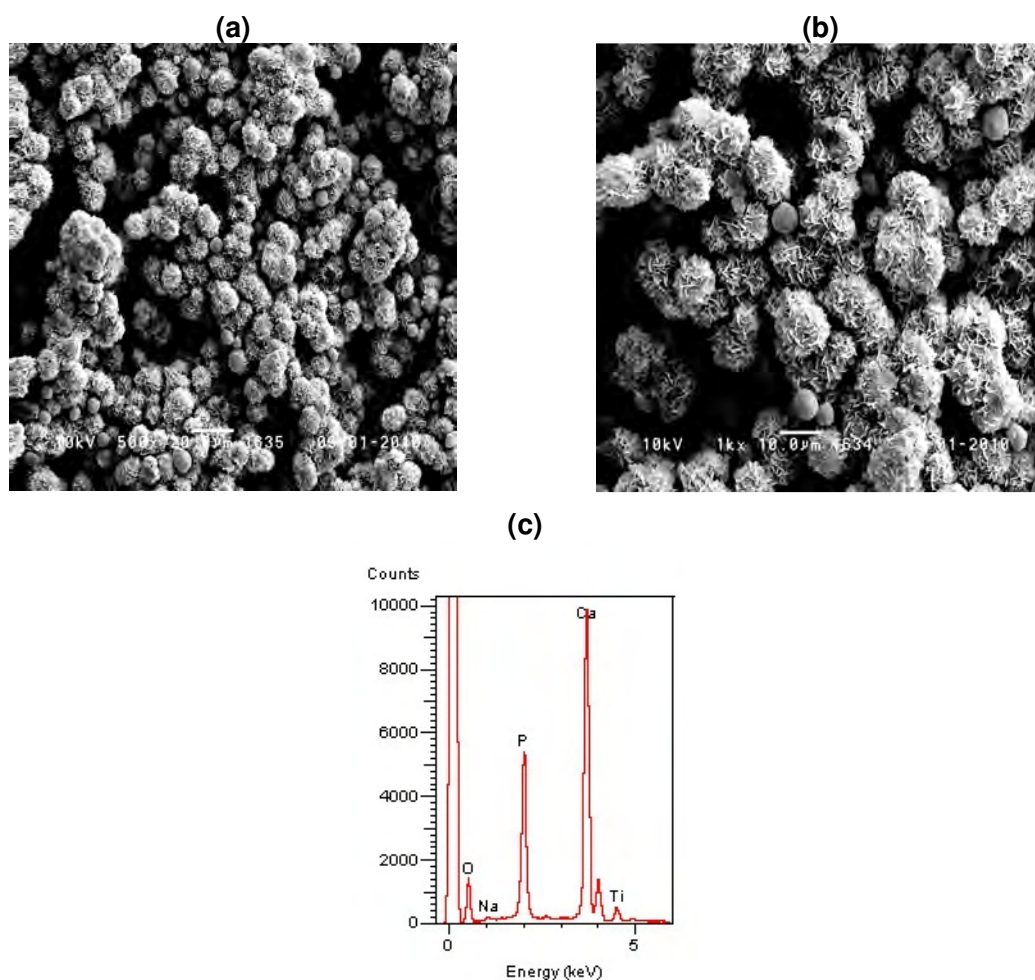


FIGURA 4.6: Liga Ti-15Mo, após modificação de superfície por feixe de Laser, ativação química com NaOH 5M e deposição de Apatitas utilizando solução SBF modificada: Micrografia MEV (a) 500x; (b) 1000x; (c) EDS.

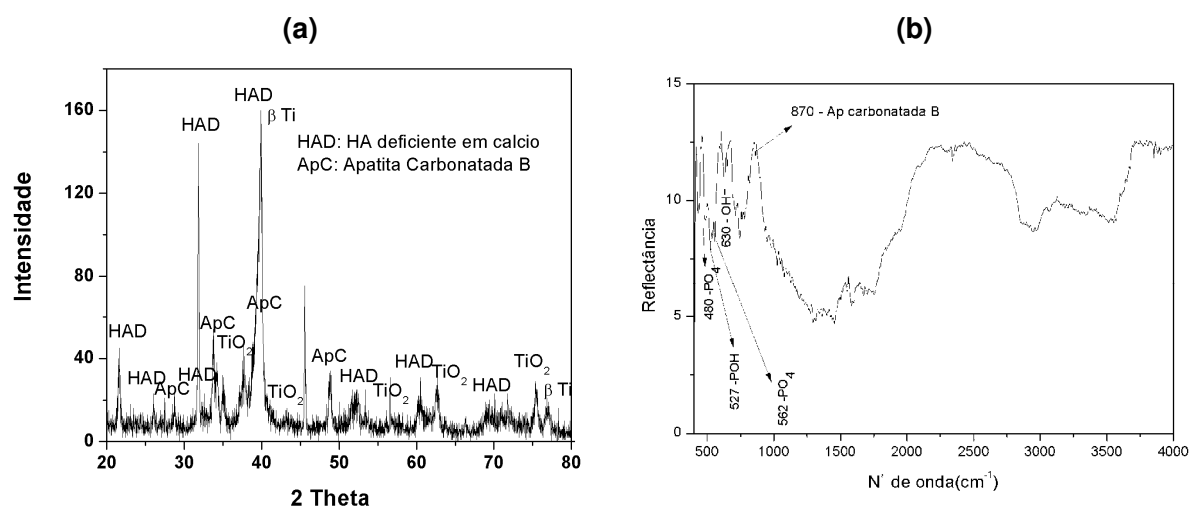


FIGURA 4.7: Liga Ti-15Mo, após modificação de superfície por feixe de Laser, ativação química com NaOH 5M e deposição de Apatitas pelo método biomimético utilizando solução SBF modificada: (a) DRX e (b) FTIR.

Tabela 4.1: Frequências de absorção no IV características dos fosfatos de cálcio.

Grupos	Número de Ondas (cm ⁻¹)
PO ₄ ³⁻	474, 562, 580, 640 e 960-1200.
P-OH	527, 870 e 910-1040.
CO ₃ ²⁻ (substituição do tipo A)	880, 1450 e 1514.
CO ₃ ²⁻ (substituição do tipo B)	870, 1412 e 1465.
OH ⁻ (livre)	630 e 3569.
OH ⁻ (H ₂ O)	1600-1650 e 3000-3700.

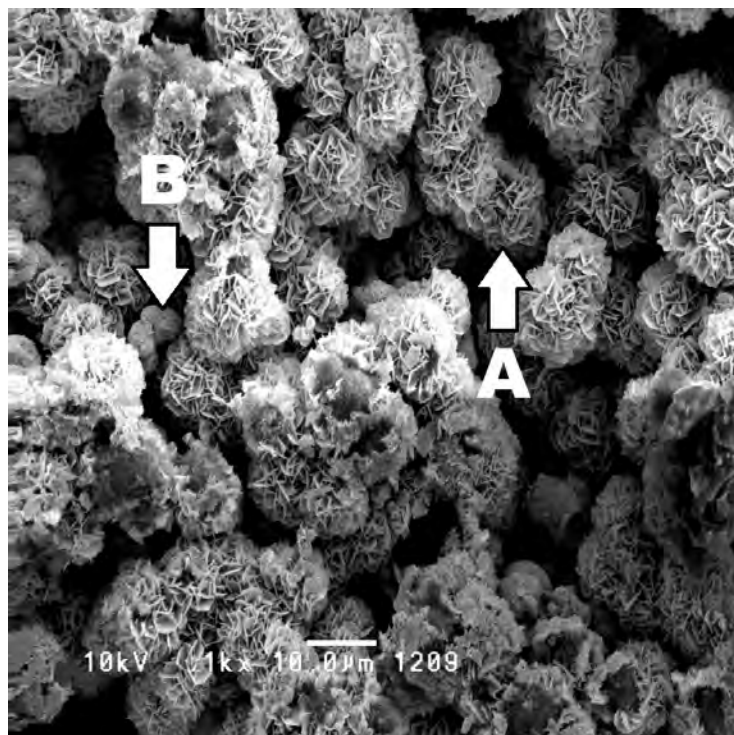


FIGURA 4.8: Grupo AP: mistura de fases correspondentes ao A - hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D) – $\text{Ca}_{9,04}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$. B - apatita carbonatada do tipo B.

4.3 Medida de ângulo de contato

No presente trabalho, as medidas de ângulo de contato foram realizadas com o objetivo de avaliar a molhabilidade da superfície modificada da liga Ti-15Mo, como resultado da irradiação por feixe de Laser e deposição de apatitas. O tratamento com laser apresentou grande influência na molhabilidade desta superfície, pois a água desmineralizada colocada na superfície usinada formou uma gota regular, com ângulo de contato de $77,97^\circ \pm 5,06$, enquanto que na superfície tratada com laser, com e sem recobrimento, a água se espalhou completamente sobre a superfície (ângulo de contato 0°). O ângulo de contato nulo encontrado para os discos tratados com e sem recobrimento indicam que a irradiação por laser usada neste trabalho é efetiva para melhorar a hidrofiliabilidade na superfície da liga Ti-15Mo, sendo promissora para uma osseointegração bem sucedida (MEKAYARAJJANANONTH; WINKLER, 1999; SPRIANO et al., 2005).

Nos últimos anos, várias modificações de propriedades específicas de superfície tais como topografia, estrutura, química, energia de superfície e molhabilidade têm sido investigadas para melhorar propositalmente a osseointegração de implantes de titânio (SCHWARZ et al., 2009). Atenção especial tem sido dirigida para altas energias de superfície e aumento da molhabilidade, já que ambas vem mostrando interações entre a superfície e o meio biológico (SCHWARZ et al., 2009). A interação inicial entre tecidos e osso vivos e a superfície dos implantes ocorre quando a superfície do biomaterial é exposta aos fluídos do organismo. Isto origina uma camada de macromoléculas e fluídos, que influencia o comportamento das células quando elas encontram a superfície do implante. Seguindo estes eventos, ocorre uma série de interações de material celular, levando a liberação de fatores quimiostáticos e de crescimentos, os quais podem modular a atividade celular no tecido adjacente (MEKAYARAJJANANONTH; WINKLER, 1999). A molhabilidade deve ser uma das propriedades de superfície a serem consideradas na seleção de um biomaterial para implantes. A capacidade de um líquido molhar a superfície de um sólido é influenciada por diversos fatores, tais como rugosidade, limpeza e energia da superfície (MEKAYARAJJANANONTH; WINKLER, 1999). Segundo PAITAL et al. (2010), quando uma gota de líquido é colocada em uma superfície com maior energia, essa superfície tende a reduzir sua energia e voltar a um estado de equilíbrio, interagindo com as moléculas presentes na gota de líquido e conseqüentemente se espalhando e melhorando a molhabilidade.

ESTUDOS *IN VITRO*

4.4 Cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1

Após o preparo e caracterização da liga Ti-15Mo com as diferentes superfícies, as mesmas foram submetidas à cultura celular a fim de se avaliar parâmetros como adesão e proliferação celular e conteúdo de proteína total, justificado pelo fato de que a atividade osteoblástica é responsável pela formação óssea nas superfícies de implantes. Apesar do grupo HA não apresentar recobrimento sobre a superfície, este grupo também foi estudado com o propósito de avaliar a influência da presença da camada de titanato de sódio em relação à cultura celular.

A utilização de cultura de células ósseas para o estudo da regulação da osteogênese tem sido gradativamente maior (ASSIS, 2008). Sistemas *in vitro* proporcionam a oportunidade de se avaliar, em um ambiente controlado, eventos celulares e referentes à matriz extracelular que ocorrem durante a formação óssea (ASSIS, 2008). Muitos eventos biológicos individuais associados ao reparo na interface osso-implante, como o recrutamento de células osteoprogenitoras, proliferação e diferenciação celular, e a produção e mineralização da matriz extracelular, podem ser investigados em osteoblastos isolados (ASSIS, 2008). Alterações do comportamento celular frente a diferentes substratos, topografia e composição de superfície, etc, podem ser determinantes no processo de formação óssea *in vivo* (ASSIS, 2008).

4.4.1 Morfologia Celular

Na Fig. 4.9 são apresentadas as diferentes superfícies da liga Ti-15Mo após 14 dias de cultura celular para os grupos experimentais U, LA, HA e AP.

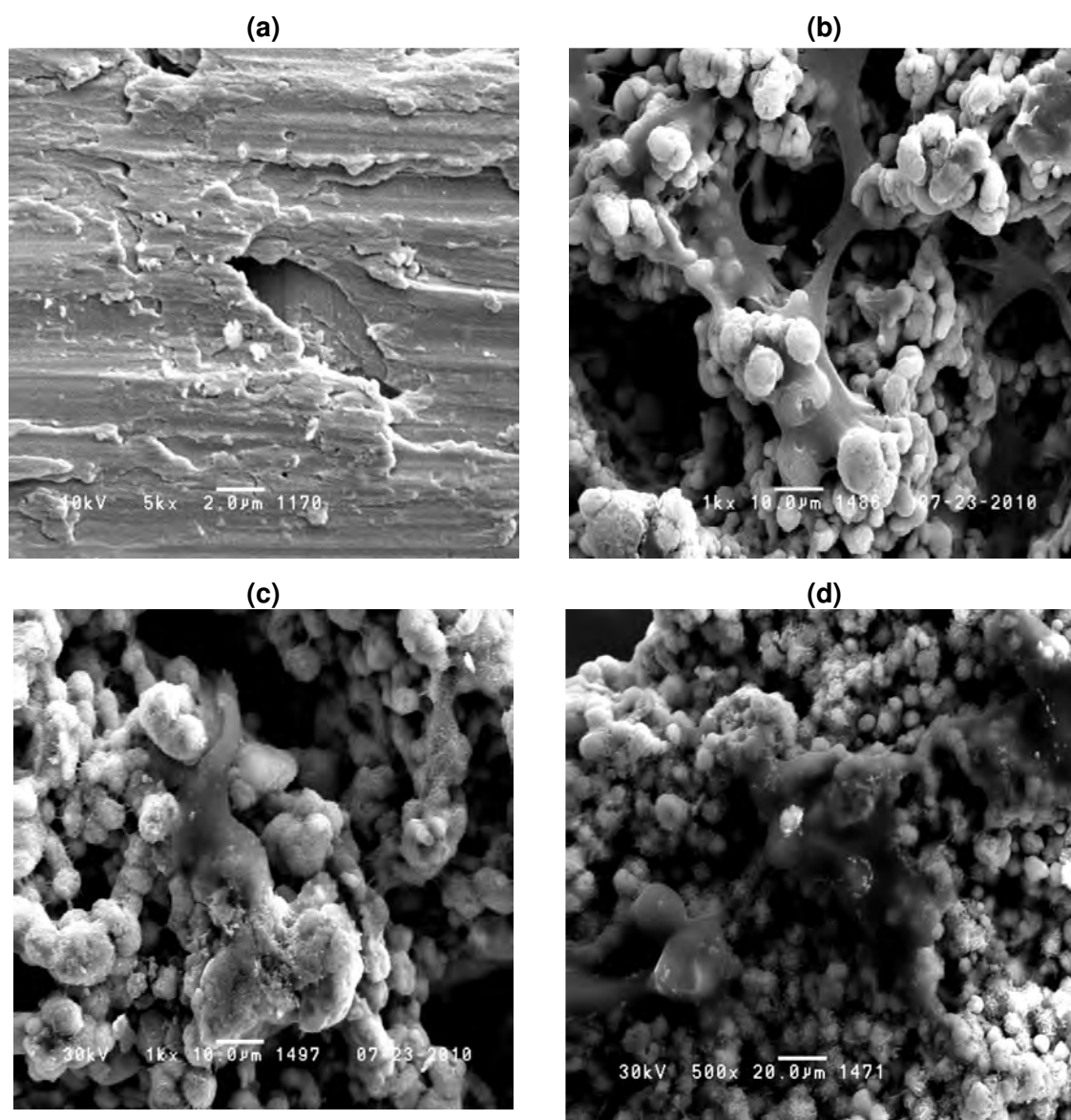


Figura 4.9: Micrografia após 14 dias de cultura de células: (a) Grupo U, (b) Grupo LA, (c) Grupo HA e (d) Grupo AP.

Observa-se que as células apresentaram diferentes morfologias entre os grupos controle (U e LA) e os que receberam tratamento de superfície com NaOH 5M e deposição de apatitas. Contudo, pode-se notar que os grupos HA e AP apresentaram células com morfologias similares. Esse fato pode ser explicado considerando-se que sobre a superfície do grupo HA, apesar de não haver recobrimento de apatita, há presença da camada de titanato de sódio, como já discutido no item 4.2, Fig. 4.5, o qual

é indutor para formação de apatitas tanto em solução SBF quanto no meio fisiológico. O contato dessa superfície e consequentemente da camada de titanato de sódio, com o meio suplementado ocasionou a adsorção de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} presentes em tal meio, levando à formação preliminar de alguma fase de apatita. Sabe-se que tanto em soluções aquosas contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} como no meio fisiológico, a primeira fase de apatita a se formar é o fosfato de cálcio amorfo (ACP) o qual se converte em hidroxiapatita deficiente em cálcio (HAD) (APARECIDA, 2006). Desta forma, pode-se concluir que a semelhança entre a morfologia das células presentes na superfície dos grupos HA e AP pode ser devido a semelhança entre a formação de titanato de sódio e a composição do recobrimento. As células também apresentaram morfologia diferenciada entre o grupo U e os outros grupos que receberam modificação de superfície. A modificação de superfície fez com que uma superfície bidimensional passe a ser uma superfície tridimensional. Com isso, as células utilizaram seus prolongamento para aderir a essa superfície, apresentando uma morfologia diferenciada, rica em prolongamentos, e bem aderida a superfície tridimensional.

A modificação de superfície por feixe de laser além de alterar as propriedades físico-químicas da superfície, proporciona um aumento da energia livre dessa superfície e da área específica da amostra. Segundo LI et al. (2008), aumentando a área de superfície, materiais microestruturados de fosfato de cálcio podem concentrar mais proteínas, o que pode influenciar a adesão, a proliferação e a diferenciação de células. O âmbito dessa influência pode ser dependente do tipo de célula utilizada. Mas estas proteínas podem incluir proteínas indutoras de osso, que poderiam diferenciar as células induzidas em células osteogênicas, induzindo a formação de osso. Foi entendido que a resposta celular a um material deve ser apenas um evento secundário. Acredita-se que uma camada de proteínas adsorvidas deve existir na superfície de todos os materiais de implante após imersão em fluidos biológicos, e a presença desta camada de proteínas pré-adsorvidas pode ser essencial na mediação da resposta celular ao material.

4.4.2 Adesão e Proliferação

Para os estudos de adesão e proliferação amostras dos 4 grupos foram analisadas, durante os períodos: 24 horas, 7 dias e 14 dias, conforme procedimento apresentado no item 3.4. Nas Figs. 4.10 a 4.13 são apresentadas as superfícies da liga Ti-15Mo com os diferentes tratamentos (U, LA, HA e AP) após os períodos de 24 h, 7 dias e 14 dias de cultura de células.

Observa-se que as amostras do grupo U foram as que apresentaram a menor quantidade de células nos períodos de 24 horas e 7 dias, entretanto, apresentaram melhores resultados no período de 14 dias, tendo sua superfície completamente recoberta por células, mesmo com um número de células bem inferior aos outros grupos (Fig. 4.10). Segundo PAITAL (2010), essa diferença de adesão e proliferação de células entre o grupo U e os demais grupos pode ser atribuída à físico-química de superfície e as diferentes rugosidades, como resultado do tratamento a laser, mostrando que a modificação de superfície leva a um aumento da área específica, fazendo com que um número de células, mesmo superior ao grupo usinado, não consiga recobrir essa superfície.

Dentre os grupos que receberam modificação de superfície, aqueles que receberam tratamento químico da superfície e recobrimento de apatita (HA e AP) mostraram os melhores resultados nos estudos de adesão e proliferação, apresentando pouca diferença entre os períodos de 24 horas e 7 dias; seguido pelo grupo LA que recebeu somente modificação de superfície por feixe de Laser. Embora o grupo HA não tenha apresentado recobrimento por apatitas, a presença da camada de titanato de sódio sobre a superfície HA pode ter induzido a formação preliminar de um recobrimento de apatita com composição semelhante ao encontrado sobre a superfície AP, fazendo com que os grupos HA e AP tenham apresentado resultados semelhantes nesta última etapa, demonstrando que o processo biomimético pode favorecer a adesão e proliferação de células na superfície da liga Ti-15Mo após modificação por feixe de laser.

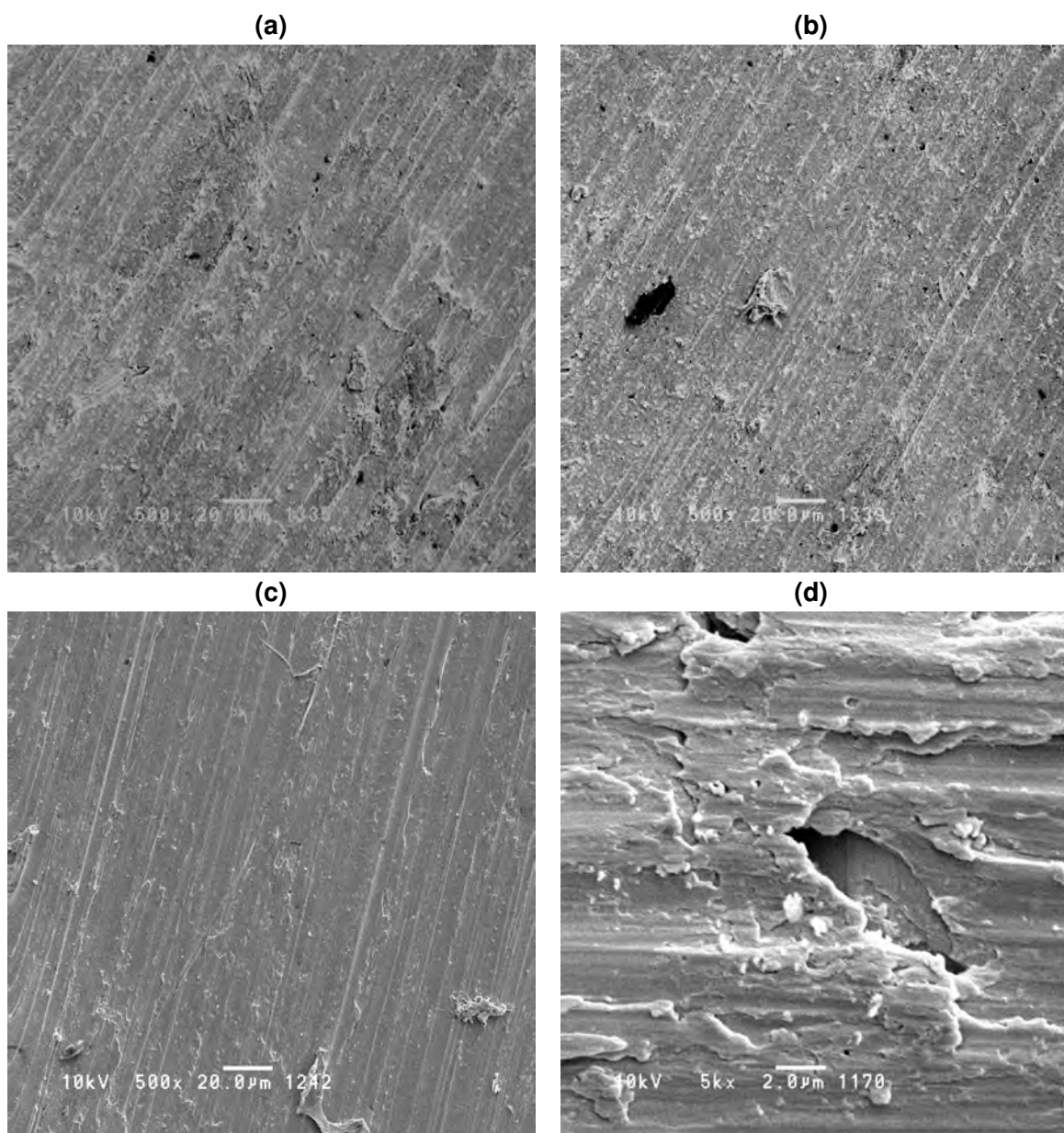


Figura 4.10: Micrografia do Grupo U (a) antes e após (b) 24 h, (c) 7 dias e (d) 14 dias de cultura de células.

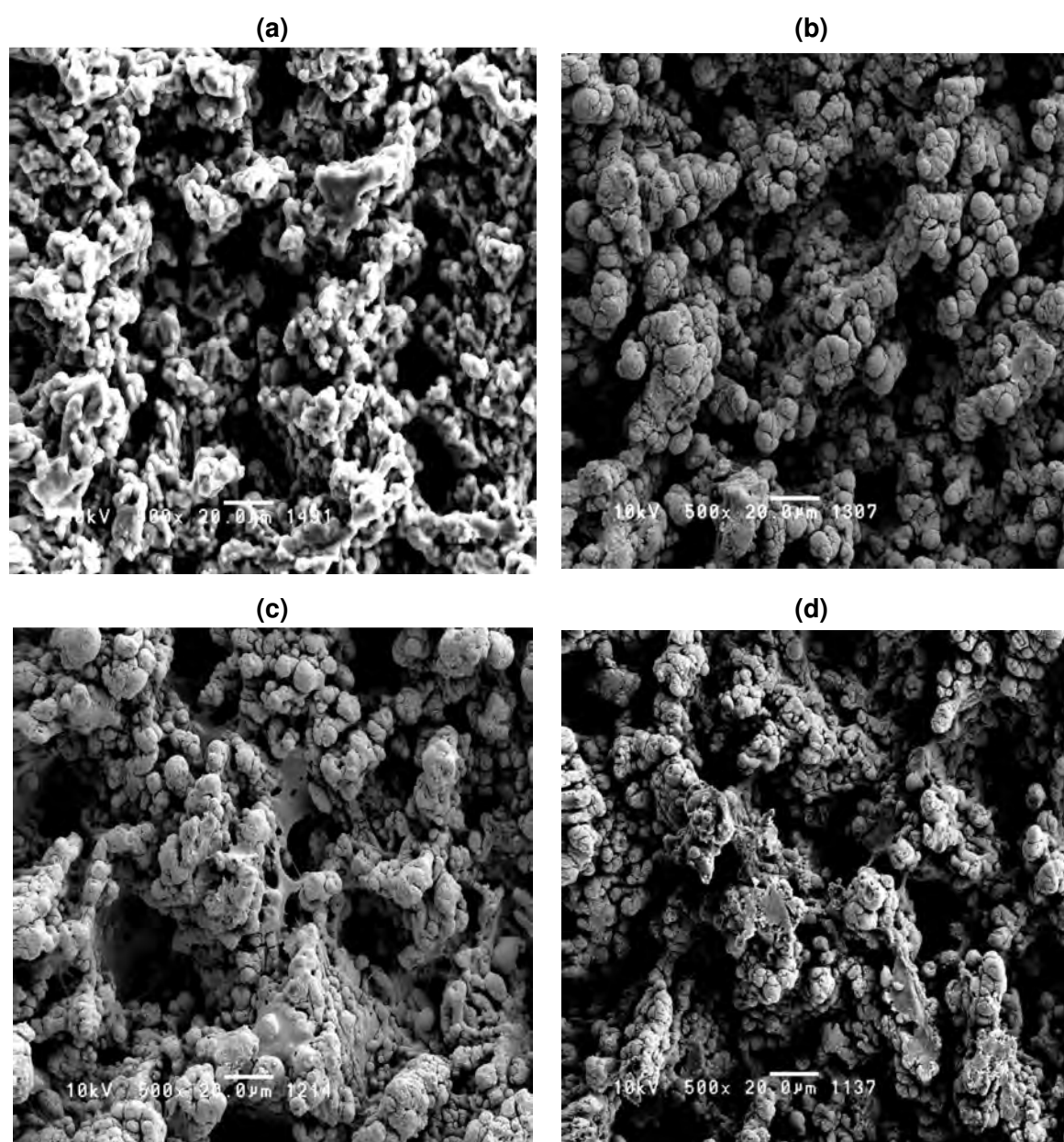


Figura 4.11: Micrografia do Grupo LA (a) antes e após (b) 24 h, (c) 7 dias e (d) 14 dias de cultura de células.

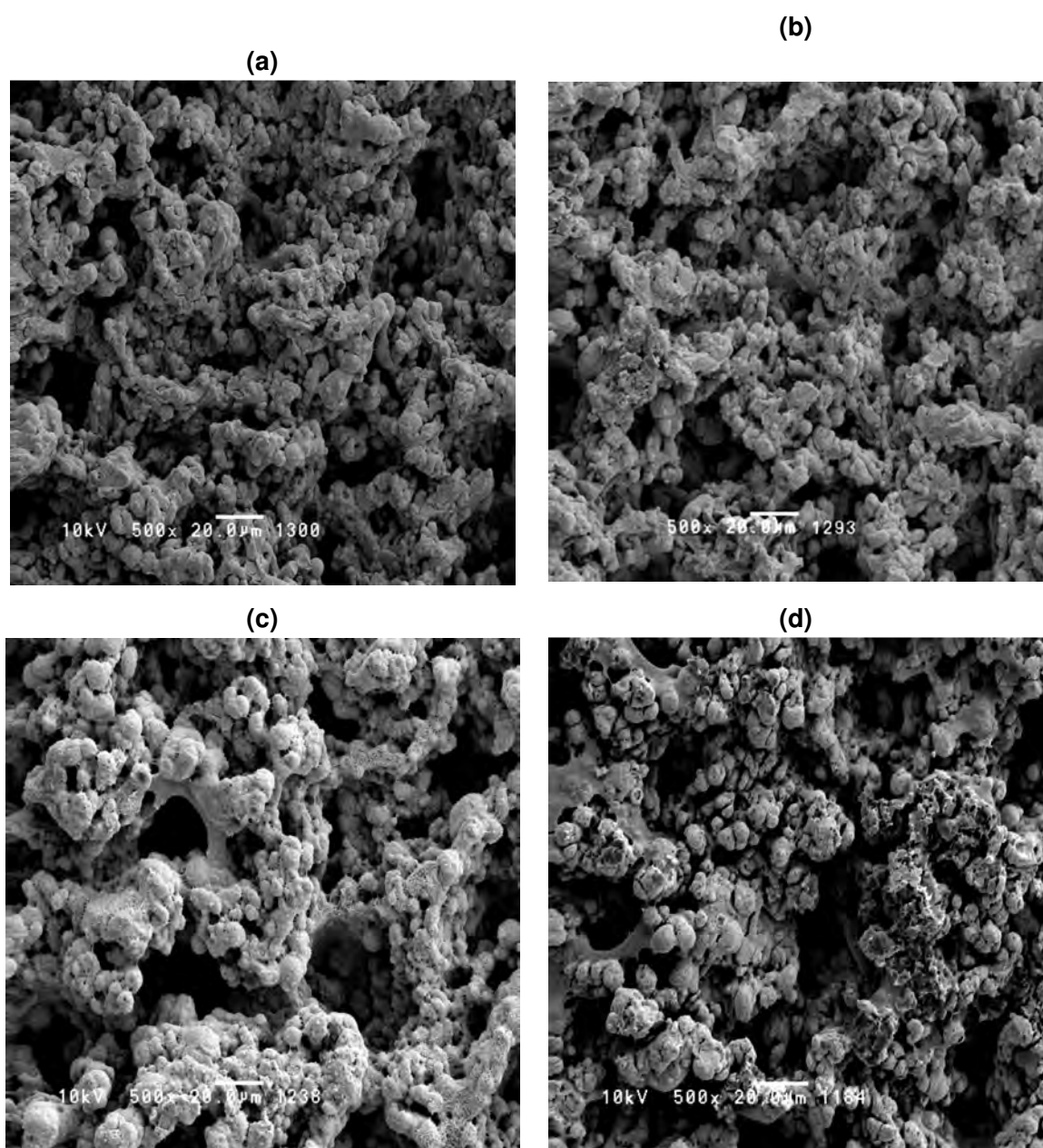


Figura 4.12: Micrografia do Grupo HA (a) antes e após (b) 24 h, (c) 7 dias e (d) 14 dias de cultura de células.

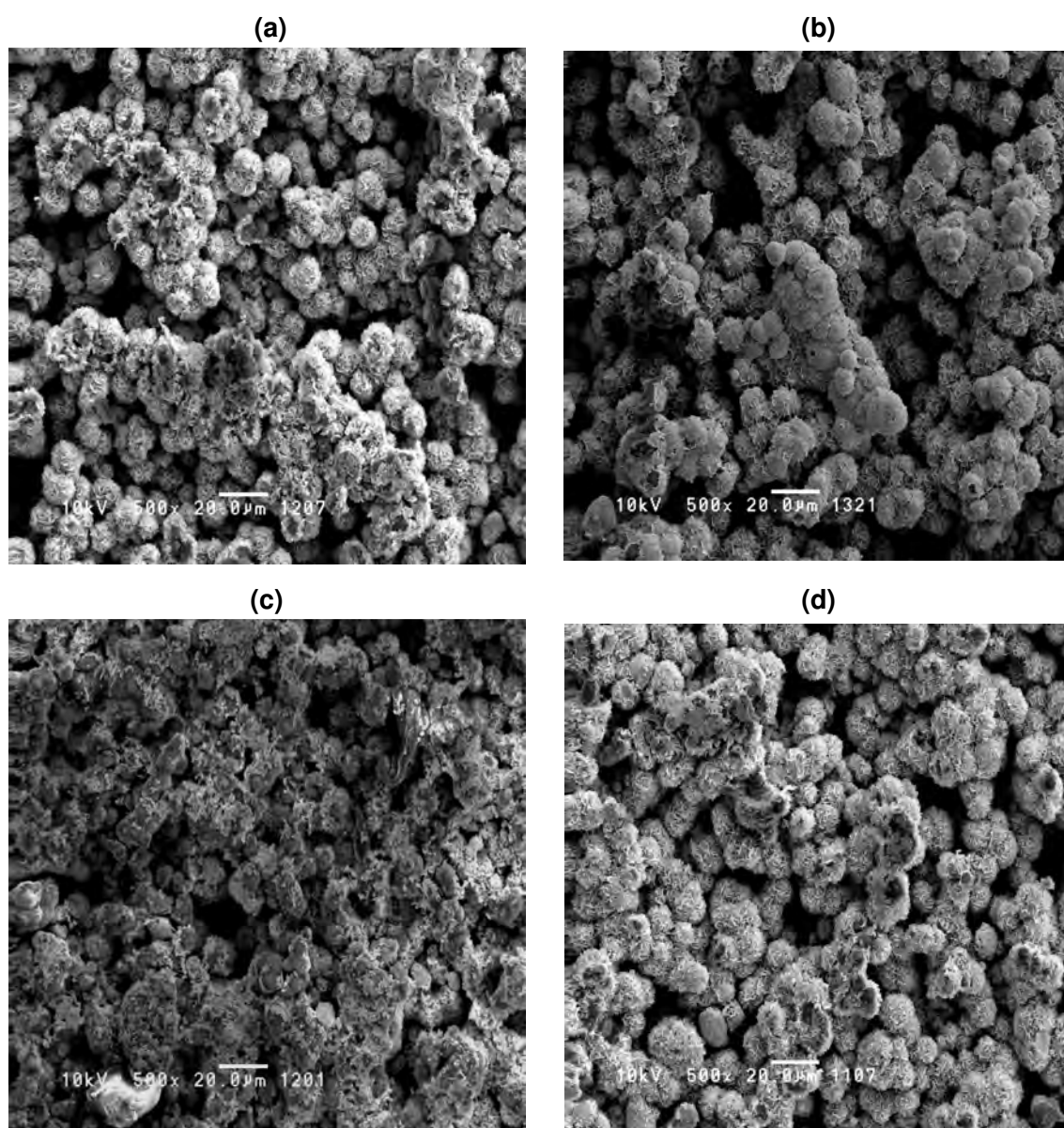


Figura 4.13: Micrografia do Grupo AP (a) antes e após (b) 24 h, (c) 7 dias e (d) 14 dias de cultura de células.

4.4.3 Contagem de células

A contagem de células foi realizada nos períodos de 5 dias e 10 dias (Fig. 4.14). O grupo U foi o que apresentou os menores valores nos dois períodos, seguido pelo grupo LA que recebeu apenas modificação de superfície por feixe de laser. Os grupos que receberam ativação química e recobrimento por apatitas apresentaram uma pequena diferença no período de 5 dias e resultados semelhantes no período de 10 dias, fazendo com que o grupo AP apresente os melhores valores para contagem de células em ambos períodos. Estes resultados confirmam os resultados discutidos no item 4.4.2 de adesão e proliferação.

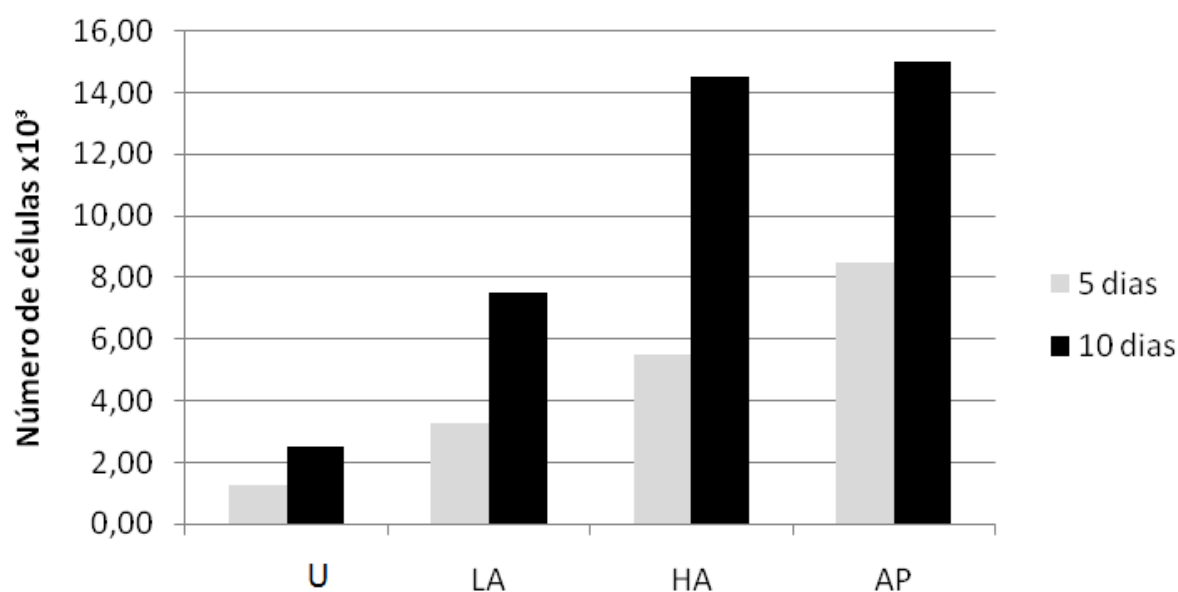


Figura 4.14: Variação do numero de células em função do período de cultura para os diferentes grupos analisados.

4.4.4 Conteúdo de proteína total

Por fim, devido à importância de determinadas proteínas no processo de osteogênese (ASSIS, 2008), a quantidade de proteína total foi avaliada sobre as diferentes superfícies nos períodos de 7 dias e 14 dias. Na Fig. 4.15 é apresentado o gráfico do conteúdo de proteína total em função do período de cultura para os diferentes grupos analisados.

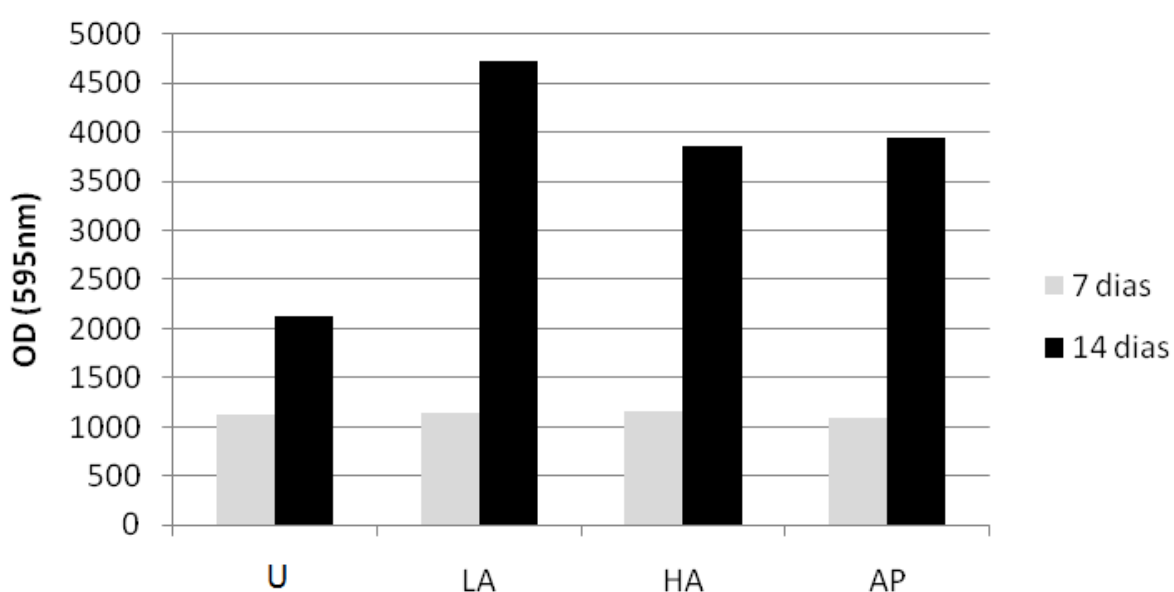


Figura 4.15: Variação dos níveis de absorbância (conteúdo de proteína total) em função do período de cultura para os diferentes grupos analisados.

No período de 7 dias, os grupos apresentaram resultados semelhantes, entretanto, no período de 14 dias, os grupos tiveram desempenho diferente, sendo que o grupo U foi o que apresentou os menores valores, seguido pelo grupo HA e grupo AP. O grupo LA foi o que mais se destacou. A análise das imagens geradas por MEV dos grupos HA e AP sugerem um estágio mais avançado de desenvolvimento celular em relação aos grupos controle (U e LA), fazendo com que o grupo LA ainda apresente um alto conteúdo de proteína total, enquanto que os grupos HA e AP já se encontravam no início da mineralização.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- O processo de modificação de superfície com irradiação por feixe de Laser promoveu modificações físico-químicas e morfológicas na superfície da liga Ti-15Mo apresentando grande influência na molhabilidade da superfície.
- Os estudos por DRX indicaram presença de TiO_2 nas superfícies tratadas por feixe de laser, além da presença da fase β do Ti, verificada em todas as amostras.
- O emprego do método biomimético para o recobrimento da superfície da liga Ti-15Mo modificada por feixe de laser somente foi adequado com emprego de uma solução SBF com composição modificada.
- Os recobrimentos obtidos utilizando-se solução SBF modificada foram compostos por 2 fases de apatita de importância biológica: hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D) e hidroxiapatita carbonatada.
- O grupo AP apresentou os melhores resultados de adesão, proliferação celular e contagem do número de células seguido pelos grupos HA, LA e U respectivamente.
- O grupo LA foi o que apresentou os melhores resultados para a análise de conteúdo de proteína total, em análises após 14 dias de cultura, seguido pelos grupos AP, HA e U respectivamente.

Baseado nesses resultados, pode-se concluir que a modificação da superfície da liga Ti-15Mo por feixe de laser, seguida do emprego do método biomimético utilizando-se solução SBF modificada melhorou a obtenção de condições biológicas favoráveis para aplicação desta liga como dispositivo ortopédico e odontológico.

REFERÊNCIAS

ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilising a biological process. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 1, n.4, p. 233-238, 1990.

APARECIDA, A. H. **Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético**: estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e HCO_3^- na formação de hidroxiapatita. 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

APARECIDA, A. H. et al. Biomimetic apatite formation on ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 6, p.1215-1222, June 2009.

ASSIS, A. F. **Desenvolvimento do fenótipo osteoblástico em células derivadas de osso alveolar humano cultivadas sobre titânio revestido com colágeno tipo I**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BRAGA, F. J. C. et al. Surface modification of Ti dental implants by Nd: YVO₄ laser irradiation. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 23, p. 9203-9208, Sept. 2007.

CAMPBELL, A. A. Bioceramics for implant coatings. **Materials Today**, v. 6, n.11, p. 26-31, Nov. 2003.

ELLINGSEN, J. E. et al. **Bio-implant interface**. New York: CRC, 2003. p. 380.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

GUO, H.; ENOMOTO, M. Surface relief effects of alpha precipitates in a Ti-Mo alloy. **Acta Materialia**, v. 5, n. 50, p. 929-941, 2002.

GUO, H.; OKUDA, K.; ENOMOTO, M. Metallurgical and materials transactions A. **Physical Metallurgy and Materials Science**, v. 3, n. 31, p. 599-605, 2000.

HABAZAKI, H. et al. Formation of barrier-type amorphous anodic films on Ti-Mo alloys. **Surface and Coating Technology**, v. 169, p. 151-154, 2003.

HACKING, S. A. et al. The response of mineralizing culture systems to microtextured and polished titanium surfaces. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 10, p.1347-1354, Oct. 2008.

HALLGREN, C. et al. An *in vivo* study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. **Biomaterials**, v. 24, n. 5, p. 701-710, Feb. 2003.

HENCH, L. L. Challenges for bioceramics in the 21st century. **American Ceramic Society Bulletin**, v. 84, n. 9, p.18-21, 2005.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, p. 518-522, 2000.

KOKUBO, T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. **Acta Materialia**, v. 46, n. 7, p. 2519-2527, 1998.

KURODA, D. et al. Design and mechanical properties of new β type titanium alloys for implants materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 29, p. 943-950, 1995.

LI, X. et al. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells *in vitro*. **Biomaterials**, v. 29, n. 23, p. 3306-3316, 2008.

LIN, C. M.; YEN, S. K. Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO₂ coatings in simulated body fluid. **Materials Science and Engineering C**, v. 26, n. 1, p. 54-64, 2006.

LIU, Y. et al. Microstructures and mechanical behavior of PM Ti-Mo alloy. **Journal Central South University of Technology**, v. 2, n. 10, p. 81-86, 2003.

MEKAYARAJJANANONTH, T.; WINKLER, S. Contact angle measurement on dental implant biomaterials. **Journal of Oral Implantology**, v. 25, n.4, p.230-236, 1999.

NIINOMI, M. et al. Corrosion wear fracture of new β type biomedical titanium alloys. **Materials Science and Engineering A**, v. 263, p. 193-199, 1999.

OLIVEIRA, N. T. C.; GUASTALDI, A. C. Estudos eletroquímicos de ligas Ti-Mo de interesse para biomateriais. **Corrosão e Protecção de Materiais**, v. 26, n. 2, p. 46-52, 2007.

OLIVEIRA, N. T. C.; GUASTALDI, A. C. Electrochemical behavior of Ti-Mo alloys applied as biomaterial. **Corrosion Science**, v. 50, n. 4, p. 938-945, 2008.

OLIVEIRA, N. T. C.; GUASTALDI, A. C. Electrochemical stability and corrosion resistance of Ti-Mo alloys for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 399-405, 2009.

OLIVEIRA, N. T. C. et al. Photo-electrochemical and impedance investigation of passive layers grown anodically on titanium alloys. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 4563-4576, 2004.

OLIVEIRA, N. T. C. et al. Development of Ti-Mo alloys for biomedical applications: microstructure and electrochemical characterization. **Journal of Materials Science and Engineering A**, v. 452-453, p. 727-731, 2007.

OLIVEIRA, N. T. C. et al. Photo-electrochemical investigation of anodic oxide films on as-cast Ti-Mo alloys. I. Anodic behaviour and effect of alloy composition. **Electrochimica Acta**, v.54, p. 1395-1402, 2009.

PAITAL, S. R. et al. Wetting effects on *in vitro* bioactivity and *in vitro* biocompatibility of laser micro-textured Ca-P coating. **Biofabrication**, v. 2, n. 2, p.1-14, 2010.

POPA, M. V. et al. The modelling of passive film formation on a new titanium industrial alloy in very aggressive media. **Revista De Chimie**, v. 56, n. 9, p. 908-912, Sept. 2005.

SAAVEDRA, A. Caracterização por raios X: difração e espalhamento. In: CURSO IBERO-AMERICANO SOBRE CARACTERIZAÇÃO DE CATALIZADORES E ADSORVENTES, 2., 2001, São Carlos. **Resumos...** São Carlos, 2001.

SAKAGUCHI, S.; NAKAHARA, K.; HAYASHI, Y. Development of sintered Ti-30mass % Mo alloy and its corrosion properties. **Metals and Materials International**, v. 2, n. 5, p.193-195, 1999.

SCHWARZ, F. et al. Review potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. **Journal of Biomedical Material Research**, Part B, v. 88d, p. 544-557, 2009.

SETO, T. et al. Evaluation of morphology and size distribution of silicon and titanium oxide nanoparticles generated by laser ablation. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 3, n. 2-3, p. 185-191, June 2001.

SPRIANO, S. et al. Surface properties and cell response of low metal ion release Ti-6Al-7Nb alloy after multi-step chemical and thermal treatments. **Biomaterials**, v. 26, n.11, p. 1219-1229, 2005.

SUGANO, M. et al. A microstructural study of fatigue fracture in titanium-molybdenum alloys. **Materials Science and Engineering**, v. A, n. 1-2, p. 163-168, 1998.

SUKEDAI, E. et al. Beta to omega phase transformation due to aging in a Ti-Mo alloy deformed in impact compression. **Materials Science and Engineering A**, v. 1-3, p. 133-138, 2003.

ULLMANN, M. et al. Nanoparticle formation by laser ablation. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 4, n. 6, p. 499-509, Dec. 2002.

VERCIK, L. C. O. **Estudo do recobrimento de hidroxiapatita sobre superfície de Ti c.p. e liga Ti-6Al-4V, sem e com deposição de TiO₂ por plasma-spray**. 2004. 127 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

VERCIK, L. C. O. et al. Recobrimento de apatitas *in vitro* sobre titânio – influência do tratamento térmico. **Eclética Química**, v. 28, n. 1, p. 25-31, 2003.

WANG, G.; WANG, H.; LIU, X. A study of the chemical composition of the passive film on a Ti-Mo alloy in HCl and H₂SO₄. **Journal of Materials Engineering Performance**, v. 2, n. 6, p. 199-202, 1997.

YANJIN, G. et al. Influence of material properties on the laser-forming process of sheet metals. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 167, n. 1, p. 124-131, 2005.

ZARDIACKAS, L. D.; MITCHELL, D. W. Characterization of Ti-15Mo beta titanium alloy. In: SOUTHERN BIOMEDICAL ENGINEERING CONFERENCE, 16 th, 1997, Biloxi. **Proceedings...** Biloxi, 1997.