

CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E BIOLÓGICA DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO TRATADAS COM HIDROXIAPATITA A PARTIR DE UMA NOVA TÉCNICA

THAÍS GIODA NORONHA¹; LUIZ ALEXANDRE CHISINI²; GIAN FRANCESCO DOS REIS PAGANOTTO³; JOSE CARLOS BERNEDO ALCÁZAR⁴; MABEL MILUSKA SUCA SALAS⁵; MARCUS CRISTIAN MUNIZ CONDE⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – thais.gioda.noronha@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – luizalexandrechisini@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – gian-paganotto@hotmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – alcazarjosecarlos0@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – terius8@hotmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – marcusconde82@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O implante osteointegrado é um substituto artificial da raiz natural de um dente perdido, atuando como suporte para coroas artificiais em pacientes totalmente ou parcialmente edêntulos. A osteointegração entre a superfície do implante e o osso adjacente é essencial para a manutenção do implante a longo prazo e é garantida pela resposta celular dos tecidos (KWEON et al, 2014). Mesmo apresentando altas taxas de sucesso clínico, existem casos em que acontece a rejeição, especialmente em pacientes com doenças sistêmicas, como osteoporose e diabetes (HERMANN et al, 2005).

O titânio é um material biocompatível, possui propriedades mecânicas e estabilidade química que induzem à reação satisfatória do tecido ósseo adjacente, o que conduz à osteointegração através da formação da matriz óssea e baixa resposta imunológica (VAN VELZEN et al, 2014). A fim de melhorar essa resposta, modificações na superfície do implante podem ser realizadas, a partir de alterações em sua superfície, que podem ser de natureza física (tratamentos mecânicos) e química (através da utilização de ácidos). Além disso, atualmente são utilizadas estratégias que se baseiam na deposição de moléculas bioativas sobre a superfície de tal material. A deposição de cerâmicas bioativas, como a hidroxiapatita (HA), um mineral componente estrutural do osso e do dente, é uma técnica muito utilizada com esse intuito, aumentando a biocompatibilidade e melhorando a formação do osso peri-implantar (HUNG et al, 2013). A maioria dos revestimentos com HA são obtidos pelo método de spray a plasma, que apresenta problemas relacionados como baixa resistência mecânica e química, falta de ligação da cobertura de interesse com o substrato, elevada espessura de cobertura e alta porosidade (CHEANG, KHOR, 1996). A utilização do método de *Dip-Coating*, para produção de filmes finos, vem sendo empregada já que promove uma melhor absorção de

fosfatos de cálcio da HA na superfície do titânio (MILELLA et al, 2001). Como poucos estudos têm avaliado esta nova técnica de deposição, o objetivo deste estudo foi avaliar a proliferação celular (células 3T3-NIH) em pastilhas de titânio recobertas com HA pelo método *Dip-Coating*.

2. METODOLOGIA

Vinte e quatro discos de titânio foram utilizados nesse estudo (4mm x 1,5mm) (Ferreira indústria dentária, Ltda). Os discos foram divididos aleatoriamente em três grupos de oito amostras cada um: um grupo controle negativo (titânio puro), um grupo com o pré - tratamento de superfície (ácido nítrico) e um grupo revestido com hidroxiapatita (HA). Os discos de titânio foram previamente polidos com tiras de carbeto de silício (80, 360, 1200), sendo refrigeradas com água destilada, por 15 minutos, para que a rugosidade superficial fosse padronizada. Após isso, todos os discos foram limpos em água destilada em uma cuba ultrassônica. Para a realização dos testes biológicos, os discos de titânio foram previamente esterilizados por radiação ultravioleta durante 1 hora em cada lado da amostra.

2.1. Tratamento das discos de titânio

O tratamento ácido foi realizado com ácido nítrico por um minuto. A neutralização do ácido foi realizada por diluição em água destilada (5min). A preparação da HA foi realizada segundo o método descrito por VARMA et al (2005). O Processo de deposição foi realizado em um equipamento que realiza banhos de imersão seguindo o método *Dip-Coating*. Foi utilizada uma garra de metal feita de aço inoxidável para fixar os discos, evitando assim, o contato do eixo da máquina. Assim, toda a superfície do disco foi mergulhada na solução. Os banhos foram realizados numa velocidade de 10 milímetros por segundo em uma solução precursora à HA. O tempo de imersão foi de 10 segundos e o tempo de emersão foi de 10 minutos. Os discos ficaram em repouso por 1 hora após o tratamento da superfície. Posteriormente, foi realizado um tratamento térmico a 450°C por 10 minutos e outro a 800°C por 2 horas.

2.2. Caracterização da superfície dos discos de titânio

Para a caracterização morfológica da superfície dos discos, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (Superscan SSX-550 SEM, Shimadzu Corporation). As amostras foram preparadas pela técnica de revestimento por pulverização com ouro a fim de se obter a condutividade necessária dos feixes de elétrons sobre a superfície. As análises foram realizadas em diferentes distâncias (40X e 1000X).

A análise química foi realizada com Espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva utilizando EDX 720 (Shimadzu Corporation). Esta análise permite avaliar e quantificar componentes químicos por meio da diferença de radiação emitida pelos átomos que compreendem o material. Os discos foram analisados, antes e após o processo de revestimento.

Para avaliar se o fosfato de cálcio seria depositado na forma de revestimento, analisou-se por difração de Raios o pó utilizado no processo sol gel, que foram submetidos a tratamento térmico a uma temperatura igual ou maior do que o utilizado no revestimento. A difração de Raios-X foi analisada no equipamento XRD-6000 (Shimadzu Corporation).

2.3. Testes biológicos: ensaio de proliferação celular

Fibroblastos 3T3 de camundongos foram cultivados em Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%. Um frasco de cultivo foi incubado em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO₂. Quando as células atingiram a subconfluência (80%), foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) removendo os metabólitos celulares. Depois disso, foi utilizada uma solução de tripsina/EDTA 0,25% por 5 minutos para destacar as células da garrafa, a qual foi inativada com o dobro de volume de meio de cultivo. Em um tubo de 15 mL colocou-se o conteúdo da garrafa para então ser levado para centrífuga, por 5 minutos, sob a rotação de 1000 rpm, ocorrendo assim a precipitação do conteúdo celular no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado 5 mL de meio DMEM suplementado com SFB (10%), após a homogeneização, foi retirado 20 µL para a contagem das células em Câmara de Neubauer. Os discos de titânio foram depositados em placas de 24 poços. Desta forma, foram semeadas 5x10⁴ células sobre cada um. A placa foi armazenada por 24 horas, para que ocorresse a adesão celular sobre tais discos. Posteriormente, os discos foram alocados em uma nova placa, com finalidade de avaliar somente as células que se apresentavam aderidas nos discos, excluindo assim, as células que se aderiram no fundo do poço.

A proliferação celular foi avaliada através de teste colorimétrico (MTT 5 mg/mL de DMEM). O MTT ficou em contato com as células por 4 horas, em estufa de CO₂, para permitir a redução do sal pela mitocôndria das células viáveis. Após o período, o meio foi sugado e foram adicionados 800µL/poço de dimetil sulfóxido (DMSO). O DMSO ficou em contato com as células por 15 minutos e em seguida a placa foi colocada por mais 5 minutos em um agitador (150 rpm). A Solução formada com o DMSO foi transferida para placas de 96 poços para que pudessem ser avaliadas por meio de espectrofotometria no leitor universal de ELISA. O comprimento de onda utilizado foi de 540 nm, onde foram considerados os valores de absorbância como indicador da proliferação celular.

2.4. Análise estatística:

Teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para se averiguar a distribuição dos dados e então foram realizados os testes ANOVA e Kruskal Wallis por múltiplas comparações. Um nível de significância de 5% foi adotado. A análise foi realizada com o software SigmaStat® (Version 3.5 for Windows®; Systat Software Corporation, San Jose, CA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que foi possível produzir um filme de HA nos discos de titânio pelo método *dip-coating*, além disto, o pré-tratamento térmico da superfície permitiu a deposição de HA sobre as pastilhas de titânio. A avaliação da adesão celular nos discos recobertos HA foi semelhante entre os grupos. A rugosidade superficial, característica importante que pode determinar a adesão celular e melhorar a diferenciação dos osteoblastos (NADDEO et al, 2015), foi preservada. O tratamento de superfície com ácidos foi realizado para melhorar a união entre o titânio e o filme de HA. O método funciona com um princípio de imersão controlada. A velocidade, o tempo de imersão e o tempo de repouso são fatores importantes que determinam a espessura da película (AKSAKAL, HANYALOGLU, 2008). Em geral, o método *dip-coating* permite a obtenção de películas mais finas, a fim de manter a rugosidade da superfície original. Camadas de revestimento mais

espessas ou irregulares podem alterar a rugosidade da superfície e produzir texturas heterogêneas. Filmes irregulares não são desejáveis uma vez que interferem na osteointegração. O pré-tratamento térmico foi realizado para tentar controlar rachaduras na microestrutura. Foi constatado também que a camada de apatita formada sobre a superfície de revestimento é capaz de suportar a proliferação das células. Além disso, a presença de outros componentes, como o magnésio, poderia aumentar a atividade das células. Não se confirmou a presença de tal elemento no estudo. Embora a espessura dos filmes possa ser considerada adequada, a medida não foi realizada. Outros estudos devem ser realizados a fim de elucidar a resistência da ligação dos revestimentos produzidos pelo método *dip-coating*, para saber se eventuais deslocamentos das películas durante o implante poderiam acontecer. O método de revestimento utilizado em nosso estudo mostrou uma alternativa viável de promover a deposição de HA.

4. CONCLUSÃO

Foi possível realizar uma deposição química de hidroxiapatita na superfície de discos de titânio utilizando o *Dip-Coating modified method*. No entanto, outros estudos avaliando diferentes propriedades mecânicas e biológicas da camada depositada devem ser realizadas a fim de elucidar com maior acurácia o comportamento desta camada formada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKSAKAL B, HANYALOGLU C. Bioceramic dip-coating on Ti-6Al-4V and 316L SS implant materials. **J Mater Sci Mater Med.** v. 19, 2097-104, 2008.
2. CHEANG P, KHOR KA. Addressing processing problems associated with plasma spraying of hydroxyapatite coatings. **Biomaterials**, v. 17 p. 537-44, 1996.
3. HERRMANN I, LEKHOLM U, HOLM S, KULTJE C. Evaluation of patient and implant characteristics as potential prognostic factors for oral implant failures. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 20, n. 2, p. 220-30, 2005.
4. HUNG K-Y, LO S-C, SHIH C-S, et al. Titanium surface modified by hydroxyapatite coating for dental implants. **Surface and Coatings Technology**, v. 231, p. 337-45, 2013.
5. KWEON H, LEE SW, HAHN BD, et al. Hydroxyapatite and silk combination-coated dental implants result in superior bone formation in the peri-implant area compared with hydroxyapatite and collagen combination-coated implants. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, p. 1928-36, 2014.
6. MILELLA E, COSENTINO F, LICCIULLI A, MASSARO C. Preparation and characterisation of titania/hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process. **Biomaterials**, v. 22, p. 1425-31, 2001.
7. NADDEO P, LAINO L, LA NOCE M, et al. Surface biocompatibility of differently textured titanium implants with mesenchymal stem cells. **Dental Materials**, v. 31, p. 235-43, 2015.
8. VAN VELZEN FJ, OFEC R, SCHULTEN EA, TEN BRUGGENKATE CM. 10-year survival rate and the incidence of peri-implant disease of 374 titanium dental implants with a SLA surface: a prospective cohort study in 177 fully and partially edentulous patients. **Clin Oral Implants Res.** 2014.
9. VARMA HK, SURESH BABU S. Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method. **Ceramics International**, v. 31, p. 109-14, 2005.