

ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES SUPERFÍCIES DO COMPÓSITO ALUMINA-ZIRCÔNIA DE NATUREZA BIOINERTE

Araújo, Onara Maísa M¹; Lombello, Christiane. B¹; Ussui, Valter²; Lima, Nelson²; Rossi, Wagner²; Ribeiro, Christiane¹.

¹ Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas – CECS, Universidade Federal do ABC - UFABC.

² Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais - CCTM, IPEN.

Av. dos Estados, 5001 - Bangú, Santo André - SP, 09210-580

onara.maisa@aluno.ufabc.edu.br

RESUMO

Diferentes técnicas para a melhora das condições superficiais vêm sendo propostas no desenvolvimento de biomateriais. Neste trabalho propôs-se um estudo comparando três padrões diferenciados de superfícies para cerâmicas 85%Al₂O₃-15%ZrO₂. Analisaram-se as propriedades superficiais das amostras após sinterização, comparando com superfícies polidas e superfícies texturizadas com laser de femtossegundo. As superfícies foram caracterizadas quanto à rugosidade média, molhabilidade e microscopia eletrônica de varredura. Analisou-se também, o comportamento de adesão celular, utilizando células Vero (ATCC, CCL- 81). Os resultados revelaram uma forte correlação entre os parâmetros de rugosidade e molhabilidade com o comportamento de adesão e morfologia celular. Observou-se que o efeito do laser tornou a superfície com tendência hidrofóbica e gerou uma microrugosidade controlada. Apesar da menor taxa de adesão, comparada às demais superfícies, houve espalhamento celular mais intenso sobre estas superfícies, além de vesículas na superfície das células aderidas, evidenciando uma favorável atividade metabólica das células neste tipo de superfície.

Palavras-chave: biocerâmicas, molhabilidade, rugosidade, adesão celular.

INTRODUÇÃO

A escolha de um material biocompatível, mesmo nos dias de hoje representa uma tarefa bastante difícil, em virtude de uma série de estudos envolvendo os materiais tradicionais até os mais inovadores, explorando as diferentes classes de materiais ⁽¹⁾, ⁽²⁾.

Dentre os biomateriais, podem-se destacar os cerâmicos, em função de uma série de propriedades como a biocompatibilidade, osteocondução e a semelhança estrutural com a fase mineral do osso, caso das cerâmicas de fosfatos de cálcio, onde é possível enquadrar tanto as bioativas quanto as

bioinertes. Já a alumina (Al_2O_3), a zircônia (ZrO_2), ou o compósito formado pela associação das duas fases apresenta uma resposta interfacial que permite caracterizá-las como bioinertes, ou seja, após implantação há formação de uma fina camada fibrosa em torno do implante, minimizando sua interação com o tecido vivo ^{(1), (2)}.

Uma das propriedades avaliadas para implantes destinados a substituição e reparo ósseo, principalmente em materiais de natureza estrutural, como as cerâmicas à base de alumina e zircônia, é a osteointegração. O conceito de osteointegração está centrado na interface osso-implante, sendo necessária, portanto, uma boa interação entre ambos. A interação do implante com células e tecidos é influenciada pela topografia, em níveis macroscópicos e pela rugosidade, a níveis microscópicos. O implante deve apresentar uma morfologia superficial que possibilite a adesão e crescimento das células ⁽³⁾.

A rugosidade superficial permite uma íntima união entre o tecido ósseo e o implante, tendo assim um papel importante nos eventos biológicos que sucedem a implantação ⁽⁴⁾. A superfície desses materiais está intimamente relacionada à energia de superfície, uma alta energia de superfície implica uma melhor molhabilidade e por consequência maior afinidade por adsorção de proteínas e, por consequência uma integração mais eficaz ⁽⁴⁾.

Atualmente vêm-se pesquisando novos tratamentos de superfície que aprimorem as propriedades físico-químicas das superfícies dos biomateriais, buscando uma melhor resposta tecidual e efetiva osteointegração ^{(4), (5)}. A proposta deste trabalho foi analisar diferentes topografias de um mesmo compósito cerâmico, em função de diferentes tratamentos superficiais. Foram correlacionados dados de rugosidade e molhabilidade com o comportamento de adesão e morfologia celular na previsão da resposta tecidual, admitindo diferentes condições de superfície (material como processado, após polimento e texturizado com laser femtossegundo).

MATERIAIS E MÉTODOS

O compósito, alumina–zircônia, 85A15Z (85% massa Al_2O_3 - 15% massa ZrO_2 estabilizada com 3 mol % Y_2O_3) foi obtido pelo método de co-precipitação de hidróxidos de alumínio, zircônio e ítrio em meio amoniacal, fixando concentração de óxidos em 35g/L, na solução de partida. Os precipitados

resultantes foram filtrados e lavados com água destilada até eliminação completa de íons cloreto e, submetidos à destilação azeotrópica para evitar a formação de aglomerados densos, durante a secagem. Em seguida, os pós foram calcinados a 800°C por 1 hora e submetidos a moagem por 16h em etanol, seguido de secagem a 80°C por 24 horas e finalmente, desaglomerados em almofariz de ágata.

Os pós obtidos, na devida composição (85A15Z), foram prensados uniaxialmente em matriz cilíndrica de 10mm de diâmetro, adotando pressão de compactação de 76MPa e sinterizados a 1650°C por 2 h em forno tipo caixa (Lindberg), adotando taxa de aquecimento de 10° C/min até 800°C e 5°C/min até temperatura de sinterização. As amostras obtidas foram separadas em 3 grupos de acordo com etapa de acabamento superficial e nomeadas como G1,G2 e G3, sendo: G1= superfícies como processadas, sem acabamento superficial; G2= superfícies polidas (acabamento final com polimento nas pastas de diamante 15 µm, 6 µm e 1µm) e G3= superfícies polidas (mesmo tratamento do grupo 2), seguida de texturização com laser de femtossegundo.

Adotou-se laser com taxa de repetição controlada de 1 a 4000 Hz; energia por pulso de até 1 mJ; largura temporal controlada a partir de 30 fs e comprimento de onda centrado em 790 nm. A partir disso, foram definidas as condições de texturização com laser femtossegundo, sem efeito térmico, para superfícies dos compósitos cerâmicos com: E= 7µJ (energia); Np= 1 (número de pulsos); F= 2,3J/cm² (fluência).

A caracterização superficial foi avaliada quanto à rugosidade média e quanto à molhabilidade. A rugosidade superficial das amostras (Ra) foi medida utilizando um rugosímetro de contato (Instrutherm RP-200). Adotou-se 3 amostras para cada grupo, e as medidas foram realizadas em triplicatas, explorando diferentes direções de varredura para uma mesma amostra. Determinou-se a média para cada grupo de amostras, obtendo-se os respectivos valores de rugosidade média para cada tipo de superfície.

As medidas de ângulo de contato foram feitas a temperatura ambiente utilizando o Tensiômetro (Attension KSV), e água destilada como fluido de deposição. Estas medidas foram realizadas criteriosamente no mesmo dia, não sendo observada oscilação de temperatura durante as medidas, considerando também o efeito de estabilidade e equilíbrio da gota. Manteve-se o mesmo

número de amostras (3) para cada grupo, sendo que para cada superfície, as medidas foram feitas em triplicatas, admitindo posições diferentes para deposição da gota.

As cerâmicas também foram caracterizadas quanto a sua interação celular por meio de testes *in vitro*. O teste de adesão foi realizado em um período de 2 horas para verificar a aderência de células ao biomaterial na fase inicial de interação. Foram utilizadas células Vero (ATCC, CCIAL-057, obtidas no Instituto Adolfo Lutz, SP), cultivadas em meio HAM F-10, com 10% de soro fetal bovino, e 10% de solução antibiótica (penicilina / estreptomicina). As células foram mantidas a 37 °C, e 5% de CO₂.

Neste ensaio uma amostra pertencente a cada grupo recebeu uma alíquota de suspensão celular contendo aproximadamente $2,6 \times 10^4$ células / mL. Após o período de 2 horas as amostras foram fixadas com glutaraldeído (2,5%). Na sequência, foi feita nova contagem de células sobre a superfície das amostras testadas, com o programa *Image J* (NHI, Bethesda, MD, USA), a fim de realizar uma comparação do número de células aderidas nas diferentes superfícies e verificar qual situação teve melhor aderência.

Com intuito de observar a influência da topografia das amostras no comportamento celular, as superfícies foram caracterizadas após processamento, antes dos ensaios *in vitro*, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando microscópio Philips - XL 30 (CCTM-IPEN). Já a morfologia celular para os diferentes grupos e adesão celular foi investigada utilizando microscópio JEOL 6010-LA (UFABC). As amostras foram mantidas em geladeira e na sequência, lavadas em água destilada, desidratadas em séries crescentes de etanol, e por último, tratadas com acetona. A análise por microscopia eletrônica de varredura foi feita após metalização das superfícies com ouro, sendo mantidas em estufa a vácuo, até o momento de observação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras obtidas apresentaram densidade equivalente a $98,6\% \pm 0,01$ Dt (densidade teórica), determinada pelo método de Arquimedes.

O difratograma na Fig.1 revelou além da fase majoritária da alumina, as diferentes fases polimórficas da zircônia presentes neste compósito. Sabe-se

que cada fase da zircônia implica em propriedades mecânicas diferentes e para a utilização desta cerâmica para fins médicos é necessária a estabilização da fase tetragonal ou cúbica a temperatura ambiente (1), (2).

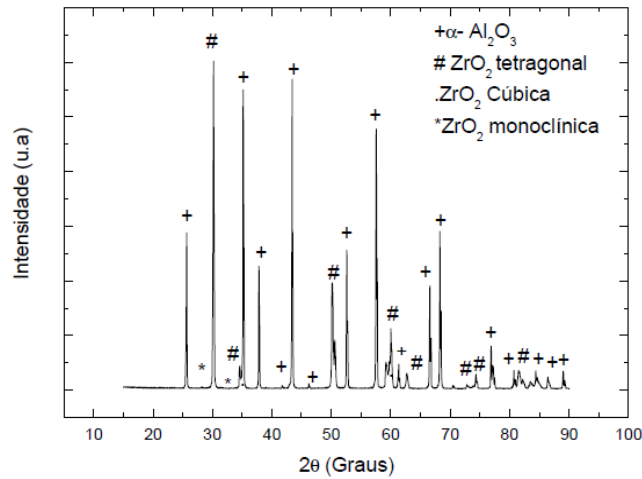


Figura 1- Difratoograma de raios X da cerâmica 85A15Z obtida.

A tabela 1 abaixo apresenta os dados de rugosidade, os valores de Rm para cada grupo de amostras, com seus respectivos valores de desvio-padrão.

Tabela 1: Valores de Rugosidade Média para os três grupos em estudo, considerando medidas em triplicata para cada amostra individual.

Grupo	G1	G2	G3
Amostra			
1	1,634 ± 0,459 µm	0,023 ± 0,009 µm	0,434 ± 0,024 µm
2	1,706 ± 0,870 µm	0,027 ± 0,004 µm	0,439 ± 0,041 µm
3	2,004 ± 0,138 µm	0,037 ± 0,012 µm	0,445 ± 0,007 µm
Médias ± erro	1,781 ± 0,489 µm	0,029 ± 0,008 µm	0,439 ± 0,024 µm

Os dados revelam que G1 apresenta maior rugosidade, comportamento já esperado, em função da ausência de etapa de acabamento superficial realizada. As superfícies G2 apresentaram uma menor rugosidade, resultado previsto por tratar-se de uma superfície que recebeu polimento. Já para G3 foi detectado comportamento intermediário na avaliação da rugosidade média. É importante ressaltar que as superfícies G3 foram submetidas a um processo prévio de polimento antes do laser. Diante disso, pode-se afirmar que os

valores de rugosidade obtidos podem estar associados à natureza da topografia superficial, sendo formado por uma região lisa, resultado do acabamento prévio, intercalada com regiões de sulco organizadas e perpendiculares entre si, resultantes do tratamento com o laser.

Diante dos valores de rugosidade média encontrados é possível enquadrar as superfícies G2 como superfícies nanorugosas (Ra inferior a 0,1 μm), enquanto as superfícies G1 e G3 são definidas pela presença de um padrão de microrugosidade (Ra de 0,1 a 100 μm) ⁽⁶⁾. Nenhum grupo ficou definido pela presença de uma macrorugosidade (Ra superior a 100 μm).

O efeito benéfico da superfície nanorugosa para um sistema material na colonização celular tem sido discutido em função do aumento da concentração de células que desenvolvem uma conformação espacial ótima para adesão mediada por proteínas ⁽⁶⁾.

Na tabela 2 estão presentes os dados de molhabilidade, os valores dos ângulos de contato medidos para os diferentes grupos.

Tabela 2: Média do ângulo de contato com o desvio padrão para as superfícies G1, G2 e G3.

GRUPO	G1	G2	G3
Amostra			
1	34,5 ° \pm 1,9	96,1 ° \pm 0,6	127,1 ° \pm 2,8
2	33,2 ° \pm 3,3	96,3 ° \pm 0,1	126,7 ° \pm 2,4
3	35,1 ° \pm 1,0	97,6 ° \pm 0,6	122,9 ° \pm 1,8
Média \pm erro	34,3 ° \pm 0,7	96,67 ° \pm 0,6	125,1 ° \pm 1,8

As superfícies das amostras G1 revelaram um valor médio de ângulo de contato, com uma tendência hidrofílica expressiva, comportamento normalmente recomendado para um melhor desempenho biológico de materiais destinados a confecção da maioria dos implantes disponíveis atualmente ⁽⁷⁾.

As superfícies das amostras G2 apresentaram um comportamento intermediário, considerando o valor médio do ângulo de contato. Durante a

coleta de dados para este grupo, as medidas apresentaram menor variação quando comparadas a G1, comportamento que pode ser comprovado pelo menor desvio padrão calculado.

As superfícies das amostras G3 apresentaram maior valor médio de ângulo de contato, tal valor reflete um caráter hidrofóbico, isso pode ser explicado devido o próprio processo de texturização. Estudos com o laser femtossegundo mencionam a ocorrência da desidratação superficial ocasionada pela alteração de grupamentos superficiais, além do fenômeno de ablação ⁽⁵⁾.

A partir do ensaio de adesão celular, avaliado em um período de 2 horas, foi possível observar para cada grupo um comportamento diferente associado à interação célula-superfície. Para a análise microscópica foram varridos 10 campos de aproximadamente 0,04 mm² para cada amostra.

O número de células foi contabilizado através do programa ImageJ, sendo observado que G3 teve o valor mais baixo de células por campo varrido, indicando que as células tiveram uma menor adesão comparada aos outros grupos de amostras. Esse comportamento pode ser explicado em função da baixa molhabilidade apresentada por esse grupo. Além disso, a microrugosidade medida nas superfícies G3 pode ter colaborado para a difícil adesão celular nestas superfícies texturizadas com laser.

Detectou-se maior número de células aderidas nas superfícies G1, tal comportamento pode ser explicado pela maior rugosidade apresentada. Segundo a literatura uma área superficial rugosa possui mais sítios para as células se aderirem do que quando comparada as superfícies G2 que passaram por etapa de polimento após seu processamento ⁽⁶⁾. Outro fator que favoreceu a adesão em G1 foi a alta molhabilidade apresentada nestas superfícies, definindo um comportamento hidrofílico bastante favorável ao condicionamento de adesão.

A Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as amostras dos três grupos, e para verificar a existência de diferença relevante entre as suas médias utilizou-se o teste de Tukey e Bonferroni (dados estatisticamente diferentes quando $< 0,05$), neste caso a ANOVA foi realizada considerando um fator único.

A partir dos resultados obtidos pelo software *GraphPad Prism 5*, aplicando a análise ANOVA e teste Tukey, verificou-se que houve diferença significativa entre os grupos (G1-G3), e entre os grupos (G2-G3). Porém entre as superfícies (G1-G2) não houve diferença estatística.

A avaliação morfológica revelou um comportamento específico para cada uma das superfícies analisadas, sendo observada maior variação entre a morfologia das células da superfície G1 frente aos demais grupos G2 e G3. Normalmente, as células Vero apresentam características de fibroblastos, morfologia achatada e alongada, e um padrão de crescimento típico, sendo a sua proliferação condicionada a existência de ancoramento ⁽⁶⁾. Na imagem comparativa (Fig.2) das micrografias obtidas por MEV, fica demonstrado como esse comportamento foi diferenciado.

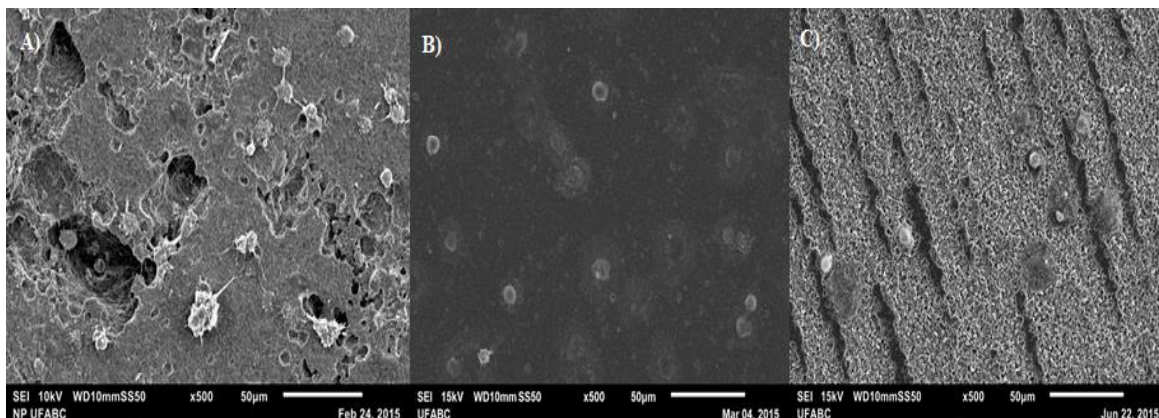


Figura 2 – Micrografias das diferentes superfícies obtidas por MEV referentes ao ensaio de adesão celular. A) superfície G1, B) superfície G2, e C) superfície G3.

Nas superfícies G1, observou-se maior adesão celular, incluindo a presença de prolongamentos oriundos do citoplasma celular, os filopódios, prolongamentos que configuram o processo de adesão celular. As saliências da membrana plasmática, como os filopódios e lamelipódios, são ricas em actina e atuam como antenas para as células investigarem o ambiente. Além disso, o alongamento destas estruturas propõe a borda das células para frente promovendo a migração celular ⁽⁶⁾. Também foi observada a presença de células aderidas no interior dos poros existentes nessa superfície, esses poros demonstraram ter tamanho suficiente para as células se aderirem. Porém, não

houve preferência de adesão nas porosidades, já que o processo de adesão espalhou-se também pela superfície da amostra. Na Figura 3-(a) está indicada pela seta uma célula aderida no interior de um poro, sendo possível visualizar os seus prolongamentos citoplasmáticos e também irregularidades (microvilosidades) sobre a superfície celular.

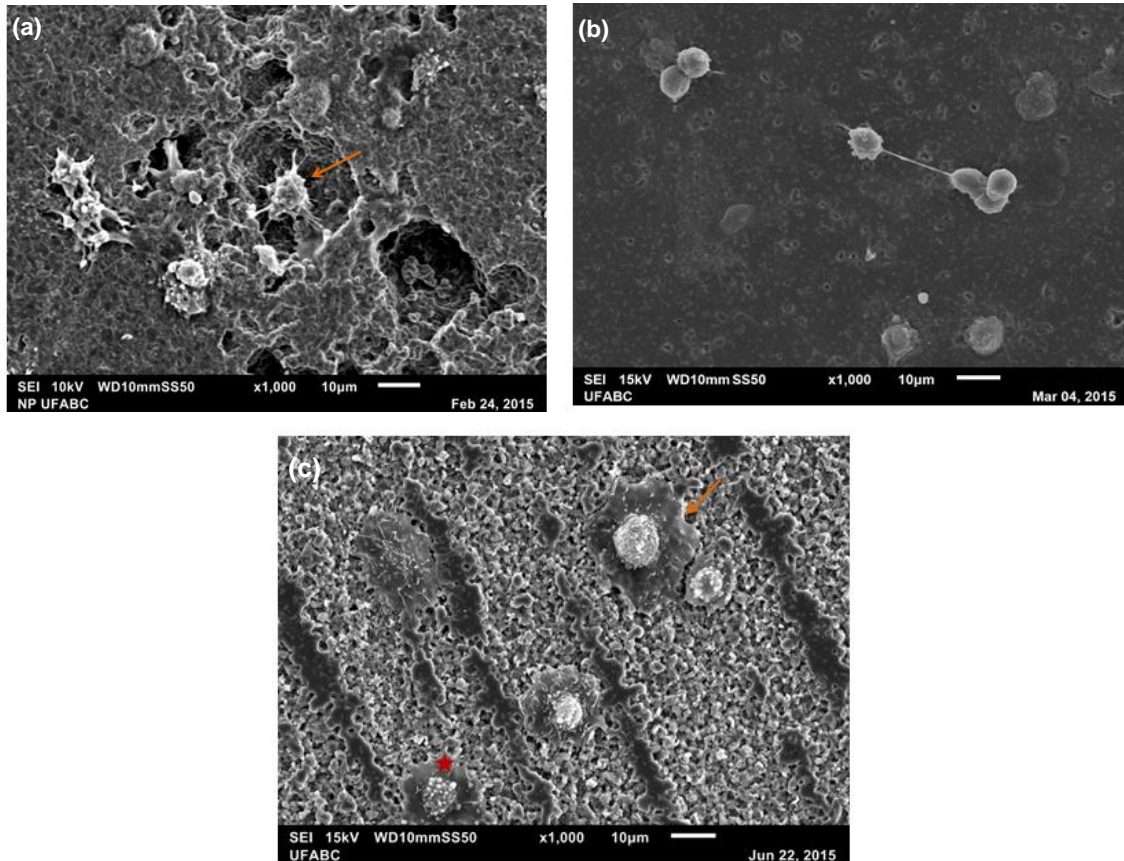


Figura 3 – Micrografias obtidas por MEV representativas das superfícies:
(a) G1; (b) G2 e (c) G3.

Nas superfícies G2, foi observado (Figura 3-b) que as células apresentaram as mesmas estruturas com formas de finas extensões, os filopódios e também tiveram uma certa expansão, porém com menor espalhamento comparada as superfícies G1.

Na superfície G3, observada na Figura 3-(c), foi revelada uma menor adesão celular, porém as células que aderiram tiveram um espalhamento mais intenso, incluindo a presença de expansões citoplasmáticas (seta), do tipo lamelipódios e vesículas (estrela) na superfície dessas células, evidenciando a atividade metabólica das células.

É importante acrescentar que as células apresentaram preferência de adesão às regiões de sulcos presentes na superfície desse grupo (G3), provavelmente por que esta é a região de maior rugosidade presente na superfície.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que as amostras submetidas ao tratamento superficial com laser femtossegundo apresentaram tendência hidrofóbica significativa, enquanto as amostras que foram polidas apresentaram comportamento hidrofóbico sutil. No entanto, as superfícies das amostras como processadas, sem nenhum acabamento superficial demonstraram comportamento hidrofílico significativo.

As superfícies G1 apresentaram maior rugosidade, seguida das tratadas com laser (G3) e por último das polidas (G2). O tratamento com laser promoveu a formação de superfícies texturizadas, de maneira controlada e reproduzível, fato que pode ser comprovado pela baixa dispersão dos valores de microrrugosidade mensurados.

Observou-se que as superfícies G1, além da maior rugosidade também apresentaram maior molhabilidade, assim a maior área superficial disponível, em função do aumento de rugosidade favoreceu a hidrofiliabilidade do material, colaborando para melhores condições de adesão celular, quando comparadas as superfícies texturizadas com laser (G3). Neste caso, as superfícies G3 apresentaram natureza hidrofóbica significativa e valores de rugosidade inferiores a G1, o que influenciou na baixa adesão celular no período de tempo investigado.

As superfícies G2 apresentaram valores de rugosidade em nano-escala, porém os valores de ângulo de contato foram intermediários, ou seja, o polimento superficial revelou uma tendência sutilmente hidrofóbica para estas superfícies, colaborando para uma maior adesão celular quando comparada as superfícies G3 (laser), de maior hidrofobicidade. Sendo assim a diminuição da rugosidade acarretou também uma redução na molhabilidade, indicando que o polimento conferiu uma redução na energia de superfície ao material tornando-o mais hidrofóbico.

A análise da morfologia celular revelou para G1, a presença de prolongamentos, que podem estar associados a maior rugosidade e área superficial deste grupo de amostras. Para G2, de menor rugosidade, houve um baixo espalhamento e uma expressiva diferença morfológica comparada a G1, reduzindo a quantidade de prolongamentos citoplasmáticos observados nas células. Para as superfícies G3, de menor adesão, ocorreu um espalhamento mais intenso, sendo observada uma expansão citoplasmática e presença de vesículas na superfície das células aderidas, além de uma adesão preferencial nas regiões dos sulcos gerados pelo laser, onde provavelmente a rugosidade é mais alta. Através do tratamento estatístico pode-se concluir que não houve diferença significativa na quantidade de células aderidas entre esses grupos (G1-G2), e sim entre os grupos (G1-G3), e entre os grupos (G2-G3).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de IC, a equipe técnica da Central Experimental Multiusuário da UFABC e também ao Laboratório de Microscopia do IPEN.

REFERÊNCIAS

- (1) RODRIGUES. L.B Aplicações de biomateriais em ortopedia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Estudos Tecnológicos em Engenharia, v.9, n.2, p. 63-76, 2013.
- (2) SANTOS K.S. Biomateriais na regeneração óssea- Revisão de literatura, 2011, 40 p. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- (3) CARVALHO. B.M, Revisão Bibliográfica dos Diferentes Tipos de Tratamento de Superfície de Implantes de Titânio e Zircônia Disponíveis no Mercado, 2010, 41p. Monografia (Especialista em Implantodontia)-Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico, Curitiba.
- (4) BRANDÃO. M.L.; ESPOSTI. T.B.D.; BISOGNIN. E.D; HARARI. N.D., VIDIGAL. G.M.; CONZ. M.B. Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica Dental implants surface X biological response: a literature review. Revista Implant News, v.7, n1, p.95-101, 2010.

- (5) AGUIAR, A.A. Avaliação do recobrimento biomimético em compósitos de alumina-zircônia texturizadas superficialmente com laser de femtossegundo. 2013. 139p. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- (6) VAGASKÁ, B.; BAČÁKOVÁ, L.; FILOVÁ, E; BALÍK, K. Review: Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*. v. 59, p. 309-322, 2010.
- (7) COLOMBO, L.M.P.C.; MATAFORA, F.L; MORO, A.F.V. Condicionamento de superfícies na Odontologia com plasma de argônio: uma revisão de literatura. *Rev. Bras. Odontol.*, v.71, n1, 2014.
- (8) OLIVIERI, K.A.N; PELISSARI, L.P.; TEIXEIRA, M. L.; MIRANDA, M. E. Avaliação da rugosidade superficial de duas cerâmicas odontológicas submetidas a diferentes tratamentos polidores. *Rev Dental Press. Estét.*, v.10, n1, p.96-107, 2013.

COMPARATIVE STUDY OF DIFFERENT SURFACES OF THE BIOINERT COMPOSITE OF THE ALUMINA-ZIRCONIA

Abstract

Different techniques for the improvement of surface conditions have been proposed in the development of biomaterials. This paper proposed a study comparing three different patterns of ceramic surfaces for 85% Al₂O₃-15% ZrO₂. The surface properties of the samples were analyzed after sintering, and were compared the surface without treatment, with polished surfaces, and textured surfaces femtosecond laser. The samples were characterized by DRX and density and the surfaces were characterized for roughness, wettability and scanning electron microscopy. It was also analyzed the cell adhesion behavior, using Vero cell (ATCC CCL-81). The results showed a strong correlation between the roughness and wettability with adherence behavior and cell morphology. It was observed that the effect of the laser made the surface exhibit a behavior hydrophobic with a tendency micro-roughness controlled and generated. Despite the lower participation rate, compared to other surfaces, there was more intense cell spreading on these surfaces, and vesicles on the surface of the adhered cells, showing a favorable metabolic activity of cells in this type of surface.

Key-words: *bioceramics, wettability, roughness, cell adhesion.*