

## AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE ADESÃO EM SUPERFÍCIES PROJETADAS DE CERÂMICAS À BASE DE ALUMINA-ZIRCÔNIA

O. M. M. Araújo <sup>1</sup>, C. B. Lombello <sup>1</sup>, V. Ussui <sup>2</sup>, N.B.Lima <sup>2</sup>, W.Rossi <sup>2</sup>, C Ribeiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do ABC - UFABC.

<sup>2</sup> Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais - CCTM, IPEN.

Alameda da Universidade, s/n, Bairro Anchieta, São Bernardo do Campo/ SP, CEP

09606-045

[christiane.ribeiro@ufabc.edu.br](mailto:christiane.ribeiro@ufabc.edu.br)

### Resumo

*Uma das alternativas para assegurar uma melhor resposta do biomaterial, diz respeito aos tratamentos de superfície, capazes de melhorar apreciavelmente a compatibilidade biológica. Diante disto, superfícies do compósito alumina-zircônia (85%Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-15%ZrO<sub>2</sub>) receberam tratamento com laser femtossegundo, com intuito de serem avaliadas quanto a adesão e morfologia celular no estágio inicial de interação, usando células Vero (ATCC, CCL- 81). Observou-se que o laser alterou a condição inicial de superfície, tornando-a com uma microrugosidade controlada e potencialmente hidrofóbica, revelando uma forte correlação entre os parâmetros de rugosidade e molhabilidade com o comportamento de adesão e morfologia celular. Tais características conduziram a uma baixa adesão, considerando toda extensão da amostra, porém com espalhamento celular pronunciado, nítida expansão citoplasmática e presença de vesículas na superfície celular, indicando uma atividade metabólica bastante favorável neste tipo de superfície, além de uma adesão preferencial nas regiões dos sulcos gerados pelo laser, onde provavelmente a rugosidade é mais alta.*

**Palavras-chave:** superfície, laser, molhabilidade, rugosidade, adesão celular.

### INTRODUÇÃO

Atualmente a escolha de um biomaterial tem sido feita com base na biocompatibilidade e na sua biofuncionalidade, de forma a garantir que o biomaterial

exerça não apenas uma compensação, mas uma participação eficiente na dinâmica fisiológica para reparação tecidual. Dentre os biomateriais, pode-se destacar as cerâmicas estruturais, como a alumina e a zircônia, ou a combinação destas duas fases em busca de um comportamento mecânico mais adequado quando são destinadas a reparação óssea <sup>(1), (2), (3)</sup>.

Compósitos cerâmicos, como o formado pela associação da Alumina ( $Al_2O_3$ ) com a Zircônia ( $ZrO_2$ ) apresentam uma resposta interfacial tecido-implante classificada como bioinerte, ou seja, após sua implantação há formação de uma fina camada fibrosa em torno do implante, apresentando quase nenhuma interação com o tecido vivo <sup>(2), (3)</sup>. Recentemente métodos alternativos de tratamento superficial, como o emprego do laser femtossegundo (tempo de duração do feixe de  $10^{-15}$  s) para texturização de superfícies, tem sido explorados visando um aprimoramento das propriedades físico-químicas da superfície de biomateriais, principalmente os ditos bioinertes, em busca de uma melhor interação e possível osteointegração <sup>(4)- (6)</sup>.

A interação do implante com células e tecidos é influenciada pela topografia em escala macroscópica e pela rugosidade admitindo escalas microscópicas. A rugosidade da superfície permite uma íntima união entre o tecido ósseo e o implante, tendo <sup>(6), (7)</sup>. O implante também deve apresentar uma morfologia superficial que possibilite a adesão e crescimento celular. Normalmente superfícies projetadas com alta reprodutibilidade ponto a ponto, isentas de contaminação e morfologia homogênea, ainda que complexa, como é o caso das superfícies irradiadas por feixes de laser laser femtossegundo, tornam possível o alcance de topografias com características favoráveis a adesão <sup>(3), (4), (6)</sup>.

Como a superfície dos implantes está intimamente relacionada à energia de superfície, uma alta energia superficial pode implicar na melhor molhabilidade e por consequência, uma maior afinidade por adsorção. Assim sendo, em teoria, implantes com maior molhabilidade devem apresentar uma interação mais eficaz, em função da melhor adsorção de proteínas <sup>(6), (7)</sup>.

Nesse trabalho avaliou-se o comportamento de adesão e morfologia celular em superfícies de cerâmicas bioinertes à base de alumina-zircônia após tratamento superficial utilizando laser femtossegundo. A propriedade de adesão foi analisada frente a resultados de molhabilidade e rugosidade superficial, a fim de comprovar um melhor desempenho na resposta tecidual.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Processamento das Cerâmicas**

O compósito cerâmico alumina–zircônia, 85A15Z (85% massa  $\text{Al}_2\text{O}_3$ - 15% massa  $\text{ZrO}_2$  estabilizada com 3 mol % de  $\text{Y}_2\text{O}_3$ ) foi obtido pelo método de co-precipitação de hidróxidos de alumínio, zircônio e ítrio em meio amoniacal. Em seguida, os pós foram calcinados a 800°C por 1 hora e submetidos a moagem por 16h em etanol, seguido de secagem em estufa a 80°C por 24 horas e finalmente, desaglomerados em almofariz de ágata.

Os pós obtidos, nas devidas concentrações de seus óxidos (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 uma taxa de aquecimento de 10° C/min até 800°C, e 5°C/min até temperatura de sinterização. Estas amostras passaram por caracterização, em estudo prévio, sendo detectada uma densificação de 98,6% para as amostras obtidas.

Na seqüência, as amostras foram polidas, empregando pastas de diamante 15  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$  e 1 $\mu\text{m}$ . Após esta etapa, as faces previamente polidas das amostras foram irradiadas com laser femtossegundo, no Centro de Laser e Aplicações do IPEN, adotando 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:  $E = 7\mu\text{J}$  (energia);  $N_p = 1$  (número de pulsos);  $F = 2,3\text{J}/\text{cm}^2$  (fluência).

### **Caracterização superficial**

A caracterização superficial das amostras foi realizada a partir de medidas de rugosidade média e ângulo de contato para previsão da molhabilidade. A rugosidade superficial das amostras ( $R_a$ ) foi medida utilizando a técnica de Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) em microscópio confocal OLS4100 Olympus. Antes de cada um dos ensaios, as amostras foram limpas utilizando ultrassom - Eco-Sonics Q3.0/40A, em água destilada por 3 minutos, e em acetona por 30 segundos, sendo mantidas em estufa a 60°C até o momento das análises.

As medidas de rugosidade foram feitas em diferentes direções de varredura. Determinou-se a média para cada superfície, obtendo valores de Ra (rugosidade média) com seu respectivo desvio padrão.

As medidas de ângulo de contato foram realizadas a temperatura ambiente, utilizando o Tensiômetro Attension KSV, e água destilada como fluido de deposição. Nesta análise foram selecionadas três amostras texturizadas com o laser femtossegundo, sendo que para cada uma delas, as medidas foram feitas em triplicatas. É importante ressaltar que para essas medidas adotaram-se posições diferentes para a deposição da gota de maneira a mapear o comportamento médio da superfície como um todo e uma região preferencial. As medidas de ângulo de contato foram realizadas criteriosamente no mesmo dia, não sendo observada oscilação de temperatura durante as medidas, estabelecendo parâmetros de medida para garantir estabilidade e equilíbrio da gota.

Com intuito também de observar a influência do laser na topografia das amostras, as superfícies foram caracterizadas antes dos ensaios *in vitro*, por microscopia eletrônica de varredura, utilizando microscópio Hitachi TM 3000.

### **Caracterização *in vitro***

As cerâmicas foram caracterizadas quanto a interação celular por meio de testes *in vitro* que consistiram na realização do ensaio de adesão celular, e complementado por análise morfológica a partir de microscopia eletrônica de varredura. Esta caracterização foi realizada após etapa de remoção de possível sujidade das amostras em banho ultrassônico - Eco-Sonics Q3.0/40A (2 sequencias em água destilada, seguida de acetona) e finalizadas por etapa de esterilização em autoclave horizontal Spencer - SP205-12.

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 CO<sub>2</sub>.

As células foram enzimaticamente ressuspendidas, com tripsina 0,25% para realizar a contagem do número de células. Para tanto foi adicionado 1 mL de tripsina 0,25% e após cerca de 5 minutos, tempo suficiente para as células se desprenderem do frasco, adicionou-se 9 mL de líquido de cultura a essas células. Uma alíquota

com cerca de 1 mL foi utilizada para contagem do número de células, utilizando microscópio óptico Axiovert (Zeiss) determinando-se o número de células / mL.

Neste ensaio cada amostra 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, as amostras cerâmicas foram mantidas em geladeira e, em seguida, lavadas em água destilada, desidratadas em séries crescentes de etanol, e por último, tratadas com acetona. A análise por microscopia eletrônica de varredura, utilizando microscópio FEI Quanta 250, foi feita após metalização das superfícies com ouro, utilizando “sputter coater” - Baltec SCD 050 e tempo de 4 minutos para deposição, sendo mantidas em estufa a vácuo, até o momento da observação microscópica.

A contagem das células sobre a superfície texturizada com laser femtossegundo foi feita com a utilização do programa *Image J* (NHI, Bethesda, MD, USA), a fim de verificar o número de células aderidas e observar o comportamento de aderência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se uma avaliação do efeito do laser femtossegundo na superfície das cerâmicas 85A15Z por técnicas de microscopia eletrônica de varredura - MEV e confocal de varredura a laser - MCVL). A Figura 1 revelou o efeito da irradiação com o feixe do laser femtossegundo sobre a superfície do compósito cerâmico, sendo possível detectar os sulcos na superfície do material, em função da passagem do laser com pulsos ultracurtos.

As bordas irregulares das trilhas (cavidades) ocasionadas pelo laser ocorrem devido à ruptura, sugerindo que o material sofreu processo de ablação sob intensa pressão. O aspecto das trilhas sugerem que há pouca evidência de fusão, sugerindo que este não é o mecanismo principal na formação dessas trilhas. Este comportamento já era previsto, considerando que pulsos ultracurtos são praticamente livres de material fundido, resultando em um processo intrinsecamente estável e reproduzível. Além disso, o alto coeficiente de expansão térmica da cerâmica induz uma maior tensão térmica, podendo ocasionar a esfoliação das cavidades <sup>(4), (5)</sup>.

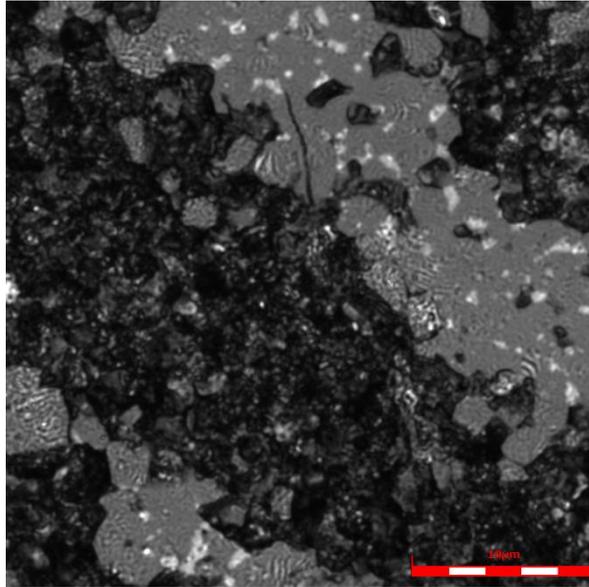


Figura 1: Micrografia obtida por MCVL, da superfície da cerâmica 85A15Z, mostrando o caminho varrido pelo laser (trilha escura) e os pontos claros referentes a fase da zircônia distribuída na matriz de alumina.

As imagens apresentadas na Figura 2A (MEV) e 2B (confocal de varredura a laser) revelam a presença de danos superficiais com a formação de trilhas com certa definição e tamanhos de partículas em escala submicrométrica, características que são típicas para amostras tratadas com laser femtossegundo de baixa energia (sem efeito térmico) <sup>(4)</sup>.

A microscopia confocal permitiu uma visualização mais detalhada da topografia da superfície, sendo possível detectar a localização das diferentes fases e da profundidade dos sulcos gerados pelo efeito da ablação do material em função do laser aplicado. Foi possível observar a zircônia (pontos claros) sobre a matriz de alumina (fase escura predominante).

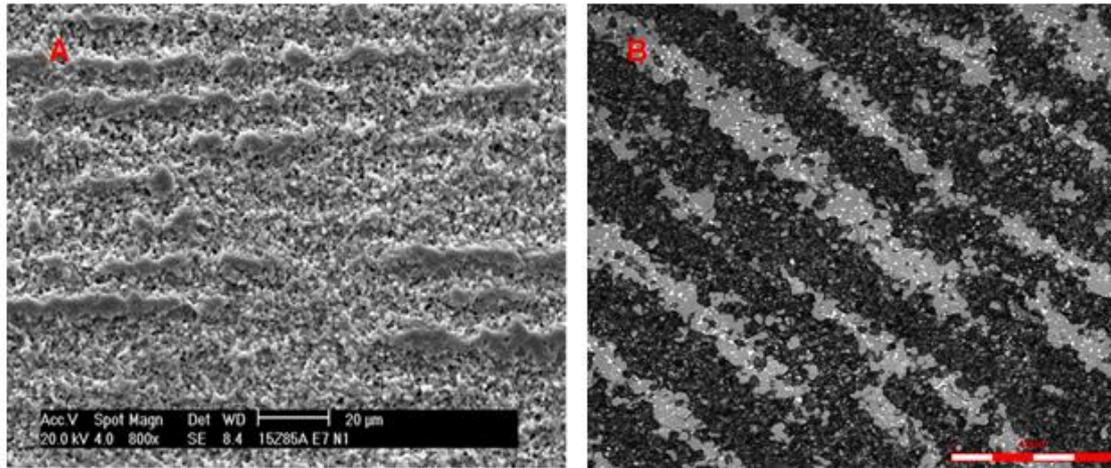


Figura 2: Imagens da superfície texturizada com laser. A) Micrografia obtida por MEV; B) Micrografia obtida por microscopia confocal de varredura a laser (100x).

Na Figura 3, estão apresentadas regiões diferentes que foram exploradas em uma mesma amostra; estas imagens foram geradas a partir do microscópio confocal a laser sob um aumento de 8000x. Trincas térmicas induzidas pelo efeito do laser foram raramente observadas na superfície das amostras, como mostra a imagem da Figura 3A (notação como estrela). Nas imagens, é possível observar pontos brancos (setas) em 3A, mais evidentes na região ascendente (topo) da superfície. Esta característica representa a fase da zircônia segregada nos contornos de grãos da alumina.

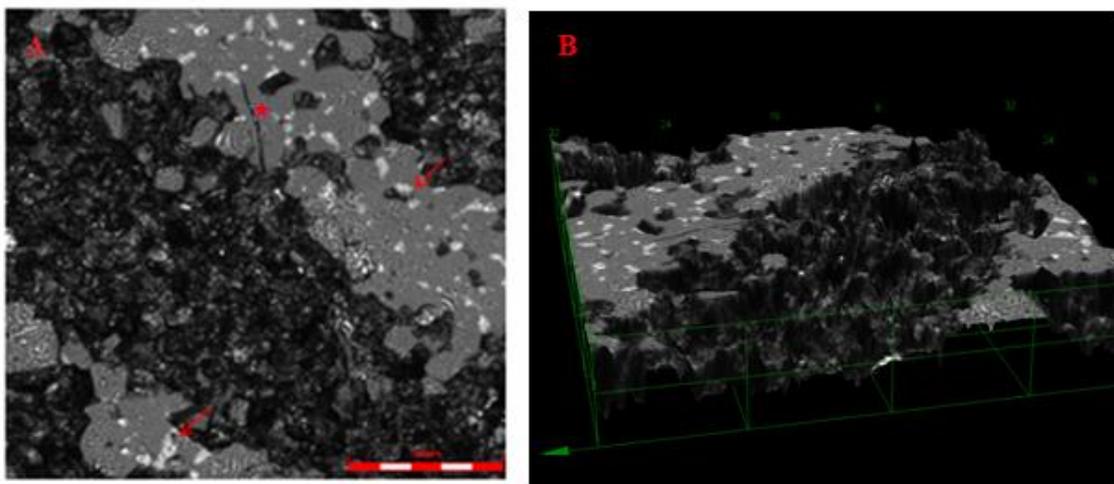


Figura 3: Imagens obtidas por microscopia a laser confocal. A) Vista superior com setas indicando a fase alumina segregada; B) imagem construída tridimensionalmente.

Além disso, por intermédio dessa técnica de microscopia confocal foram medidos os valores de rugosidade da superfície da amostra, sendo adotadas diferentes orientações para medida e, sobre estas, feita a varredura pelo laser. Foram geradas curvas de rugosidade para cada medida, podendo ser obtido diferentes parâmetros, no entanto, neste estudo foi selecionado o parâmetro de rugosidade média (Ra). Nas imagens da Figura 4, observa-se a interface do programa, e no canto superior, a imagem traçada com a respectiva orientação escolhida, e sua curva de rugosidade.

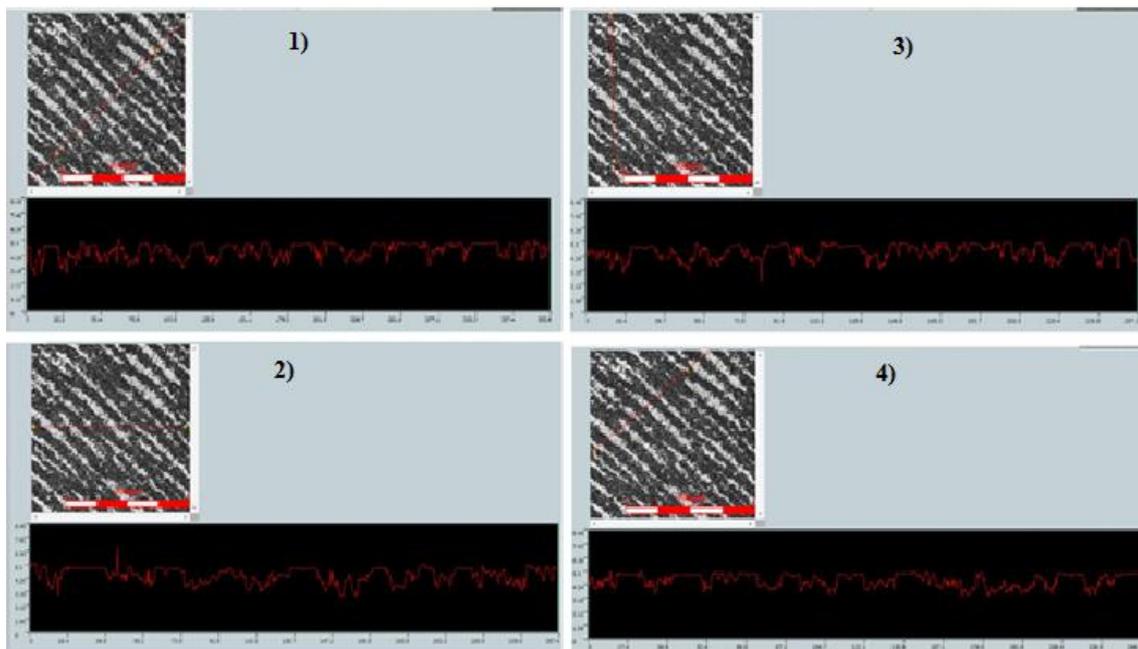


Figura 4: Interface gerada pelo programa representando diferentes direções de varredura (1 a 4), junto com a respectiva curva de rugosidade.

Para análise de rugosidade foram obtidos os seguintes valores demonstrados na tabela I.

Tabela I: Valores de Rugosidade Média representativos de diferentes orientações para a amostra texturizada com laser femtossegundo.

Direção da medida	1	2	3	4	Média ± erro
Rugosidade média (µm)	0,441	0,492	0,435	0,437	0,451 ± 0,02

A partir desses dados obteve-se um valor de rugosidade média igual a  $0,451 \mu\text{m} \pm 0,02$ , percebe-se uma semelhança entre os valores coletados, sendo comprovado em função de um erro associado relativamente pequeno. A baixa dispersão dos valores medidos comprova a reprodutibilidade da técnica com o laser, obtendo superfícies facilmente projetadas, com uma textura controlada. Ainda é possível afirmar que a diferença nos valores medidos por esta técnica estão relacionadas as diferentes regiões varridas pelo laser. Desta forma, quando o percurso do laser envolveu uma maior área, intercalando maior número de depressões e topos na superfície, os valores de rugosidade foram mais elevados. É importante ressaltar que os valores de rugosidade média obtidos pelo método mecânico, em estudo prévio, utilizando rugosímetro de contato foi bastante aproximado, ou seja, a rugosidade média medida pelo rugosímetro foi de  $0,439 \mu\text{m} \pm 0,024$  para o mesmo tipo de amostra. A partir dos dados percebe-se que as amostras apresentaram um comportamento dentro de uma avaliação da rugosidade média, definida como superfícies microrrugosas ( $>1 \mu\text{m}$ ) <sup>(5)</sup>.

Na tabela II estão apresentados os valores dos ângulos de contato medidos nas superfícies de diferentes amostras cerâmicas, em triplicatas.

Tabela II: Média do ângulo de contato com o desvio padrão.

<b>GRUPO</b> <b>Amostra</b>	<b>Valor do ângulo de contato</b>
<b>1</b>	$127,1^\circ \pm 2,8$
<b>2</b>	$126,7^\circ \pm 2,4$
<b>3</b>	$122,9^\circ \pm 1,8$
<b>Média ± erro</b>	$125,1^\circ \pm 1,8$

As superfícies dessas amostras apresentaram um alto valor médio de ângulo de contato, tal valor reflete um caráter hidrofóbico ao material. Essa tendência de comportamento pode estar associada ao próprio processo de texturização com este tipo de laser. Estudos com o laser femtossegundo mencionam a ocorrência da desidratação superficial ocasionada pela alteração de grupamentos superficiais, além do fenômeno de ablação <sup>(4) – (6)</sup>.

A partir do ensaio de adesão celular, avaliado em um período de 2 horas, foi possível observar um comportamento associado à interação célula-superfície.

O número de células foi contabilizado através do programa ImageJ, e com isso foi possível observar que as superfícies das cerâmicas texturizadas com o laser tiveram um valor pequeno de células por campo varrido. Esse comportamento pode ser explicado em função da baixa molhabilidade apresentada. Além disso, a microrrugosidade apresentada pela amostra (inferior a 0,5  $\mu\text{m}$ ) pode ter comprometido a adesão celular nas superfícies texturizadas com laser, por toda extensão da amostra.

A superfície da amostra após o ensaio *in vitro* pode ser observada na Figura 5. Apesar da baixa adesão celular, em termos quantitativos, as células que aderiram tiveram um espalhamento intenso, incluindo a presença de expansões citoplasmáticas, do tipo lamelipódios e vesículas na superfície dessas células. Tais características direcionam para uma atividade celular metabólica favorável no estabelecimento de uma interface com tecido mineralizado, por exemplo <sup>(6)</sup>, <sup>(8)</sup>.

Observou-se também que as células apresentaram uma região preferencial de adesão nas cavidades ou sulcos gerados pelo laser, provavelmente em função da maior rugosidade destas regiões.

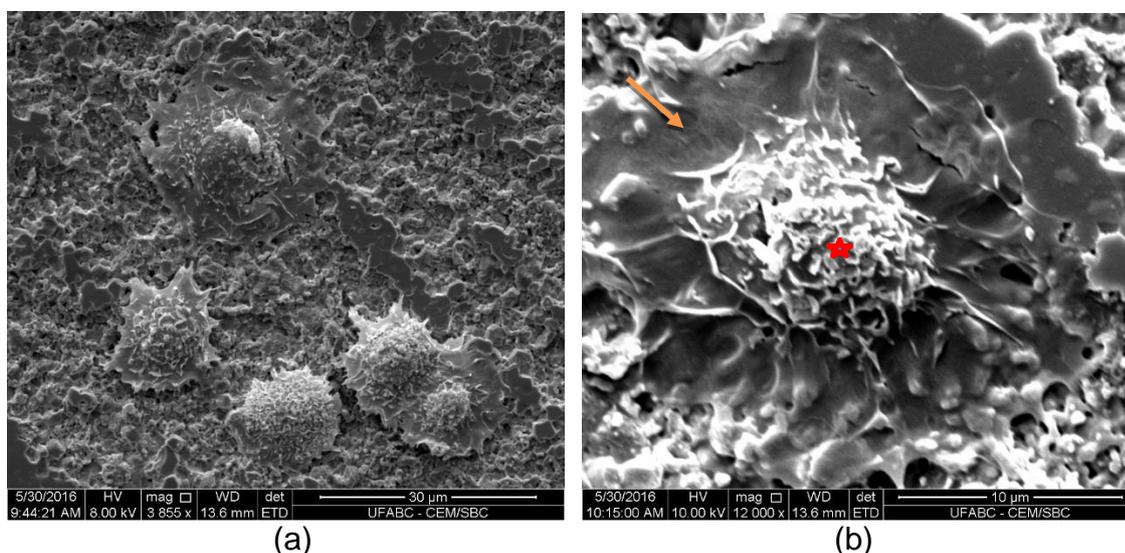


Figura 5 – Micrografias representativas da superfície obtida por MEV; (a): visão panorâmica da superfície com presença de células aderidas e (b) imagem de célula aderida indicando expansão citoplasmática (seta) e presença de vesículas (estrela).

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que as amostras submetidas ao tratamento superficial com laser femtossegundo apresentaram tendência hidrofóbica significativa. 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. A união dessas duas características: hidrofobicidade significativa e rugosidade inferior a 0,5  $\mu\text{m}$  comprometeram a adesão celular, considerando um tempo inicial de interação.

Apesar da baixa adesão, considerando toda extensão da amostra, ocorreu um espalhamento intenso, sendo observada 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. Tais características podem revelar uma condição de interface favorável a reparação tecidual óssea.

De forma geral, os estudos revelaram que existe uma forte correlação entre os parâmetros analisados (rugosidade, molhabilidade) com o comportamento de adesão celular e também na avaliação morfológica das células.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de Iniciação Científica concedida, aos laboratórios das Centrais Experimentais Multiusuários da UFABC e ao Centro de Lasers e Aplicações do IPEN pela disponibilidade e parceria

## **REFERÊNCIAS**

- (1) ONG. K.L., et al. New biomaterials for orthopedic implants. *Orthopedic Research and Reviews*, v.7, n1, p.107-130, 2015.
- (2) AFFATATO. S., RUGGIERO. A., MEROLA., M. Advanced biomaterials in hip joint arthroplasty. A review on polymer and ceramic composites as alternative bearings. *Composites Part B* (2015), doi: 10.1016/j.compositesb. 2015.
- (3) SANTOS K.S. Biomateriais na regeneração óssea- Revisão de literatura, 2011, 40p. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.
- (4) FEEMANN, M.E.; GALVANAUSKAS, A.; SUCHA, G. Micromachining. In: *Ultrafast lasers: Technology and applications*. New York: Marcel Dekker Inc., 2005.
- (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, São Paulo.

(6) 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, Pr.

(7) INOKOSHI, M.; VANMEENSEL, K.; ZHANG, F.; DE MUNCK, J. Aging resistance of surface-treated dental zirconia. *Dental Materials* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2014>.

(8) DE BRANDÃO, M.L.; ESPOSTI, T.B.D.; BISOGNIN. E.D, CONZ. M.B. Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica Dental implants surface X biological response: a literature review . *Revista Implant News*, 7(1), p.95-101, 2010.

## EVALUATION OF ADHESION BEHAVIOR ON DESIGNED SURFACES IN ZIRCONIA-ALUMINA BASED CERAMIC

### ABSTRACT

An alternative to improve response biomaterial refers to surface treatments, able to improve pronouncedly biological compatibility. Thus zirconia-alumina (85% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-15% ZrO<sub>2</sub>) composite were textured surface with femtosecond laser in order to assess adhesion behavior and cell morphology in the initial stage of interaction, using *Vero cell* (ATCC, CCL- 81). It was observed that the laser changed the initial surface condition, leading to controlled micro-roughness and potentially hydrophobic, showing a high correlation between the roughness and wettability parameters with adhesion and cell morphology. These characteristics have led to decrease adhesion, considering entire size of the sample, but with marked cell spreading, unmistakable cytoplasmic expansion and presence of vesicles at the cell surface, indicating a favorable metabolic activity in this type of surface. In addition it was noticed a preferential adhesion in the regions of grooves generated by the laser, which is probably where the roughness is higher.

**Key-words:** *surface, laser, wettability, roughness, cell adhesion.*