



## **Análise da correlação entre rugosidade e viabilidade celular em ligas de titânio.**

**Renato Trevilato<sup>1\*</sup>, Julia Scaramel Furlan<sup>2</sup>, Aline Maria Machado<sup>3</sup>, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo<sup>4</sup> e Armando Ítalo Sette Antonialli<sup>5</sup>**

*1 - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica (PPGEMec)*

*2 - Curso de Licenciatura em Química*

*3 - Curso de Bacharelado em Biotecnologia*

*4 - Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF)*

*5 - Departamento de Engenharia Mecânica (DEMEc)*

*Universidade de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP*

[rtrevilato@estudante.ufscar.br](mailto:rtrevilato@estudante.ufscar.br); [juliafurlan@estudante.ufscar.br](mailto:juliafurlan@estudante.ufscar.br); [mmachado2@hotmail.com](mailto:mmachado2@hotmail.com);

[hsaraujo@ufscar.br](mailto:hsaraujo@ufscar.br); [antonialli@ufscar.br](mailto:antonialli@ufscar.br)

### **RESUMO**

*O comportamento celular exhibe íntima relação com a superfície do material, sendo a caracterização da rugosidade um caminho importante para compreender a viabilidade de um biocomponente. Este trabalho envolve a caracterização da superfície de duas amostras da liga Ti-6Al-4V ELI, usinadas com parâmetros de avanço distintos, quanto à rugosidade aritmética média ( $R_a$ ), rugosidade skewness ( $R_{sk}$ ) e a rugosidade kurtosis ( $R_{ku}$ ) e ainda a análise da viabilidade dos fibroblastos FHH-1 em ensaios celulares. Como era de se esperar, a amostra usinada com alto avanço apresentou maior rugosidade média do que aquela de baixo avanço. Com relação ao comportamento celular, embora ainda de forma inconclusiva, pode-se inferir que a superfície usinada com menor avanço e, conseqüentemente, com menor  $R_a$ , apresentou melhores resultados, o que está em consonância com a literatura.*

**Palavras-chave:** *biocompatibilidade, usinagem, integridade superficial.*

### **INTRODUÇÃO**

A liga Ti-6Al-4V ELI exhibe grande relevância na fabricação de biocomponentes por apresentar maior biocompatibilidade em comparação a outras ligas metálicas utilizadas em próteses na área médico-odontológica<sup>(1)</sup>. A resposta de biomateriais ao comportamento celular tem íntima relação com a integridade superficial, uma vez que essa superfície constitui a plataforma de migração, adesão e crescimento celular<sup>(2)</sup>. Na zona de interação entre a superfície do material e do meio biológico em que é instalado, mecanismos biológicos, físicos e químicos irão modular a adsorção de proteínas, cuja natureza e quantidade irão impactar diretamente na migração, adesão e proliferação celular<sup>(3,4)</sup>. Destaca-se que a camada de proteínas adsorvida irá alterar a interface de modo a prepará-la para a colonização celular futura<sup>(5)</sup>, além disso, são capazes de induzir interações indiretas entre as células e o material<sup>(6)</sup>. Rezende *et al.*<sup>(7)</sup> colaboram afirmando que a qualidade e a quantidade dos tecidos de reparação guardam uma estreita relação com o acabamento superficial.

A rugosidade média ( $R_a$ ) é um parâmetro que mostra, a partir da linha média, a média aritmética dos valores de picos e vales, sendo insensível e genérico, porém de grande valia em análises comparativas. Associados a ela, utilizam-se os parâmetros estatísticos de rugosidade: rugosidade *skewness* ( $R_{sk}$ ) e a rugosidade *kurtosis* ( $R_{ku}$ ), que evidenciam, respectivamente, a simetria entre picos e vales e sua repetibilidade, importantes parâmetros de distribuição de perfil e o comportamento da liga quanto ao desgaste e à resistência mecânica<sup>(8)</sup>.

Assim, elege-se a rugosidade e a análise de seus parâmetros estatísticos como importantes variáveis de saída e de distribuição, evidenciando o comportamento da liga, quanto a resistência mecânica, resistência à corrosão e à fadiga, permitindo compreender a relação entre a integridade superficial e o comportamento celular. Diferentes estudos sugerem maior proliferação de fibroblastos em ligas de Ti-6Al-4V, quando comparado a outras ligas, conforme afirmam Ponsonnet *et al.*<sup>(9)</sup>. Verificou-se, nesse caso, que valores elevados de rugosidade propiciam maior superfície de contato, tornando mais eficiente a adesão de osteoblastos sobre titânio comercialmente puro. Notou-se, ainda, que valores de rugosidade superiores a um determinado limiar prejudicam a migração celular<sup>(10)</sup>. Análises complementares evidenciam que, em maiores rugosidades, há maior proliferação celular. Posto isso, a discordância dos dados referentes à integridade superficial e sua relação com o comportamento celular justifica estudos detalhados em torno da viabilidade dos biomateriais. Por conseguinte, o objetivo principal deste trabalho consiste em compreender como a rugosidade interfere no comportamento celular; o que envolve preparação e caracterização da superfície das amostras de titânio por meio da microscopia confocal, a condução de testes de proliferação celular sobre as superfícies produzidas e, por fim, a correlação entre a viabilidade de um tecido sob diferentes condições de superfície.

## MATERIAIS E MÉTODOS

De maneira a compreender como a rugosidade influencia no comportamento e a viabilidade celular, foram preparadas amostras a partir de barras de seção circular da liga de titânio alfa-beta Ti-6Al-4V ELI, cujos requisitos metalúrgicos para fabricação e aplicação em implantes cirúrgicos são estabelecidos pela norma ASTM F136<sup>(11)</sup>.

Esses corpos de prova consistem em pequenos discos de 8,0 mm de diâmetro por 2,0 mm de espessura, faceados em torno mecânico convencional utilizando bedame da Sandvik Coromant<sup>(12)</sup> composto por um porta-ferramentas (código RF123G20-2020B) com inserto de metal duro com cobertura tripla-camada CVD TiCrN+Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+TiN (R123G2-0300-0502-CM 2135), ângulo de folga de 7° e raio de ponta igual a 0,2 mm.

Foram mantidas constantes a rotação do eixo-árvore  $n = 300$  rpm, e a profundidade de usinagem, igual à largura do bedame,  $a_p = 3,0$  mm. A única variável empregada na usinagem das amostras foi o avanço:  $f = 0,038$  mm, condição denominada “baixo avanço” ou  $f = 0,198$  mm, condição denominada “alto avanço”. Cada condição foi replicada três vezes e não foi empregado qualquer fluido de corte durante a usinagem.

Após a preparação das amostras, as mesmas foram submetidas a uma caracterização superficial no microscópio confocal *Alicona Infinity Focus SL* utilizando uma lente objetiva de aumento 10x. Assim, obtiveram-se os parâmetros  $R_a$  (rugosidade aritmética média),  $R_{sk}$  (fator de assimetria do perfil) e  $R_{ku}$  (fator de achatamento do perfil), empregando-se um *cut off* de 0,8 mm para superfícies com rugosidade média entre 0,1 e 2,0  $\mu\text{m}$  e *cut off* de 2,5 mm para superfícies com rugosidade média entre 2,0 e 10,0  $\mu\text{m}$ , conforme especificação da norma NBR ISO 4288<sup>(13)</sup>.

Para o ensaio de viabilidade e proliferação celular foi utilizada uma placa para cultivo de células com 24 poços de fundo chato, volume entre 0,38 a 0,57 mL, modelo K12-024, Kasvi divididos em triplicata: três poços com apenas fibroblastos FHH-1 para controle; três poços

com as amostras na condição de “baixo avanço” e fibroblastos; e, por fim, três poços com as amostras na condição de “alto avanço” e fibroblastos. As superfícies das amostras foram semeadas com 1 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco Mem-COD.D0025) 4,5g/L high glucose (Vitrocell®), suplementado com 10% soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum-Vitrocell®*), a uma concentração de 5.000 células/mL, aproximadamente 36,8  $\mu$ L de células. Após 24h, o meio foi removido e substituído por uma solução de meio de cultura contendo 10% de AlamarBlue. As placas foram ainda incubadas na incubadora a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> (*Model 3110 Spectrum Series II water Jacket CO<sub>2</sub> incubator, Thermo Scientific*) durante 4 horas. Aliquotas de 100  $\mu$ L foram transferidas para poços de placas de 96 poços e a diferença de absorção em 570 nm e 600 nm foi medida em um espectrofotômetro multiplaca (SpectraMax® 190) por meio de fluorescência. Os ensaios em curso foram realizados nos períodos de 24 horas, 48 horas e 72 horas, repetindo-se os procedimentos externados. Como controle, o AlamarBlue (*Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha*) foi adicionado ao meio de crescimento celular sem células.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização da superfície das amostras nas condições de alto e baixo avanço, bem como nas duas regiões de medição, periférica e central podem ser observadas na Figura 1.

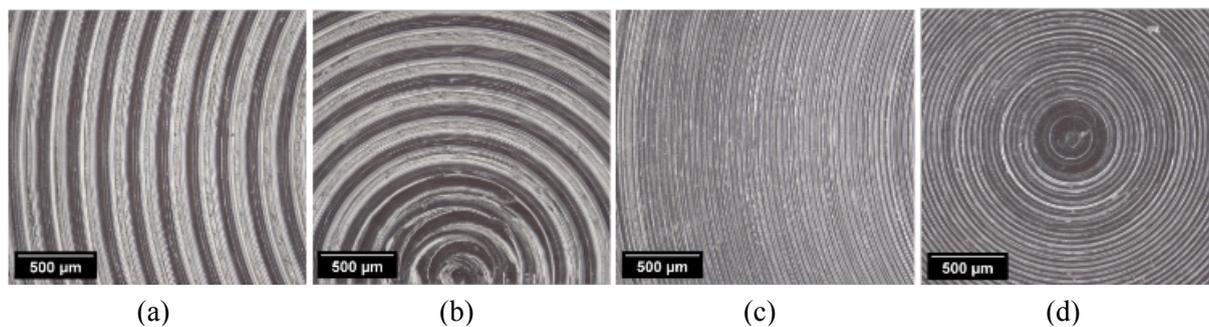


Figura 1: Microscopia confocal das amostras (a) alto avanço, região periférica e (b) alto avanço, região central; (c) baixo avanço, região periférica e (d) baixo avanço, região central.

Do ponto de vista da análise de variância, considerando um intervalo de confiança de 95 %, não se deve rejeitar a hipótese nula com relação ao efeito do tratamento ou do bloco para os resultados de  $R_a$ ,  $R_{sk}$  ou  $R_{ku}$ . Entretanto, com uma ligeira redução do intervalo de confiança (ou seja, aumento da significância, ou probabilidade de erro do tipo I, o falso positivo), já é possível rejeitar a hipótese nula para o efeito do tratamento sobre o parâmetro  $R_a$ . Em outras palavras, a influência do avanço sobre os resultados de  $R_a$  é estatisticamente significativa ( $p$ -valor = 0,059); mas não se pode dizer o mesmo sobre a região analisada da amostra ( $p$ -valor = 0,569). Nesse sentido, a condição denominada "baixo avanço" provê uma superfície que atende à classe de rugosidade N8 ( $R_a < 3,2 \mu\text{m}$ ), ao passo que a condição denominada "alto avanço" só garante a obtenção de uma superfície classe N9 ( $R_a < 6,4 \mu\text{m}$ ) conforme a norma ISO 1302<sup>(14)</sup>. Esses dados estão apresentados na Figura 2.

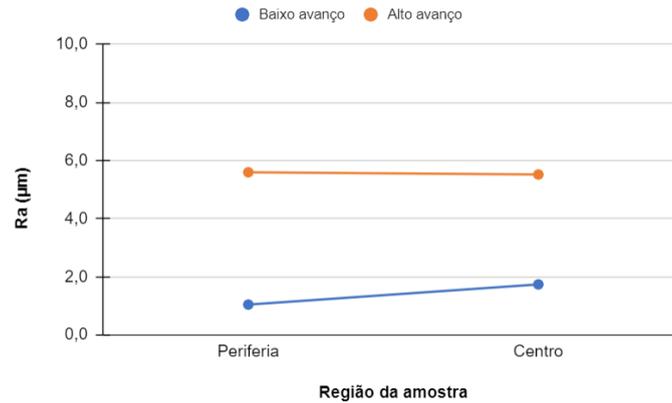


Figura 2: Valores de rugosidade aritmética média ( $R_a$ ).

Com relação ao parâmetro  $R_{sk}$ , a influência do avanço (p-valor = 0,658) ou da região analisada da amostra (p-valor = 0,373) não é estatisticamente significativa. Em termos da assimetria entre picos e vales na superfície das amostras, a média das observações ( $R_{sk} = 0,190$ ) indica uma distribuição quase simétrica, com ligeira predominância de vales. De qualquer forma, a Figura 3 indica uma tendência maior de variação para a condição “baixo avanço”, que propicia valores médios entre -0,749 e 0,768, ao passo que a condição “alto avanço” garante valores de  $R_{sk}$  positivos entre 0,217 e 0,523 (Figura 3a). Com relação ao parâmetro  $R_{ku}$ , a influência do avanço (p-valor = 0,260) ou da região analisada da amostra (p-valor = 0,582) não é estatisticamente significativa. Em termos da forma da curva de distribuição de rugosidade, a média das observações ( $R_{ku} = 2,510$ ) indica que a superfície das amostras apresenta um repetibilidade um pouco aquém da curva gaussiana para  $R_{ku} = 3,0$  (Figura 3b).

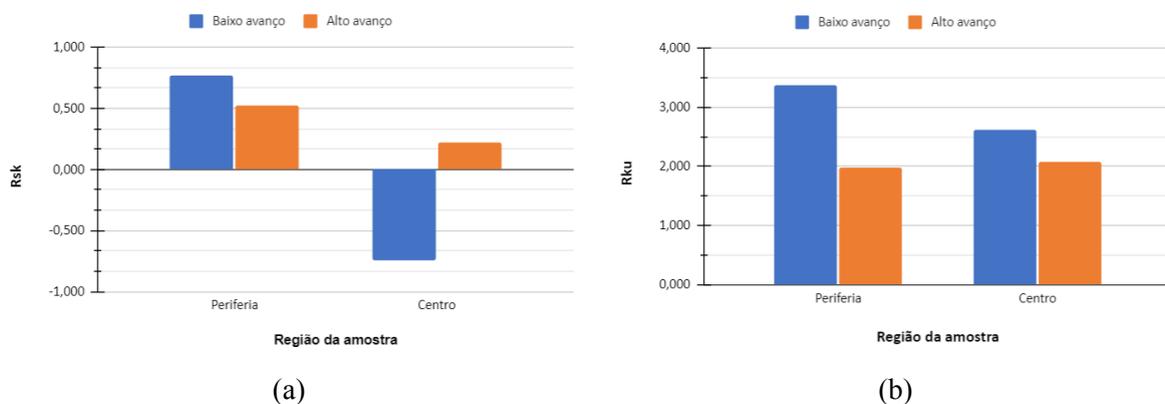


Figura 3: Valores dos parâmetros de (a) assimetria ( $R_{sk}$ ) e (b) curtose ( $R_{ku}$ ).

Vale ressaltar que os resultados foram apresentados em bloco para a região da amostra analisada (centro ou periferia) em razão da inerente variação da velocidade de corte ( $v_c$ , m/min) durante a fabricação das amostras, conforme explicitado na Equação (A), em que  $D$  (mm) é o diâmetro da amostra ao longo do avanço radial da ferramenta e  $n$  (rpm) a rotação do eixo-árvore do torno. A preocupação se justifica em razão da possibilidade de formação de aresta postíça de corte por efeito da baixa velocidade no centro das amostras e conseqüente elevação da rugosidade nesta região. No entanto, não se verificou diferença estatisticamente significativa para qualquer um dos parâmetros de rugosidade avaliados e, assim, supõe-se que a heterogeneidade da amostra não se configura uma fonte de variabilidade em termos de viabilidade e proliferação celular.

$$vc = \frac{\pi \cdot D \cdot n}{1000} \quad (A)$$

Ensaio preliminares do comportamento celular após 24h evidenciaram baixíssima viabilidade celular em comparação com a condição de controle (Ctl) nas duas condições analisadas, como observado na Figura 4. De qualquer forma, a condição de baixo avanço (LF) aparenta ser menos agressiva do que a condição de alto avanço (HF). Ainda que os resultados sejam pouco conclusivos, eles estão em consonância com Ponsonnet *et al.*<sup>(10)</sup>. Novos ensaios serão realizados para compreender melhor essa relação.

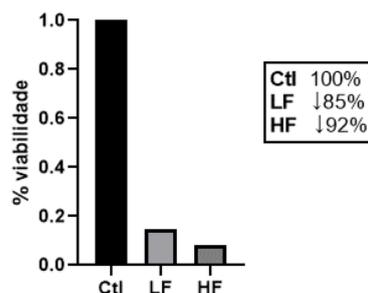


Figura 4: Viabilidade celular na condição controle (Ctl) em baixo avanço (LF) e alto avanço (HF).

## CONCLUSÕES

Os valores de  $R_a$  mostram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, ou seja, a condição de baixo avanço propiciou rugosidade menor do que a de alto avanço. Por outro lado,  $R_{sk}$  e  $R_{ku}$  se mostram aproximadamente idênticos. Em relação à viabilidade celular, estima-se que a condição de baixo avanço seja mais interessante; no entanto, os resultados preliminares são, ainda, inconclusivos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica (PPGEMec), ao Departamento de Engenharia Mecânica (DEMec) e ao Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

## REFERÊNCIAS

1. GONÇALVES, V. M. Estudo da molhabilidade da superfície de titânio modificada por anodização eletroquímica para crescimento de nanotubos, FOA/UNESP, Araçatuba, SP, Brasil, 2016.
2. RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, 2 ed., San Diego: Academic Press, 2004.
3. MARTINS O. P. M. Estudo, in vivo, de uma hidroxiapatite de arquitetura otimizada (tese de mestrado). Coimbra: Universidade de Coimbra; 2009.
4. FERREIRA E. S. Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos (tese de doutorado). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2009.
5. NYGREN H.; TENGVALL P.; LUNDSTRÖM I. The initial reactions of TiO<sub>2</sub> with blood. J Biomed Mater Res. 1997;34(4):487-92.
6. DOLATSHAHI-PIROUZ A. *et al.* Bovine serum albumin adsorption on nano-rough platinum surfaces studied by QCM-D. Colloids Surf B Biointerfaces. 2008;66(1):53-9.

7. REZENDE, M. C. R. A. *et al.* Osseointegration of anodized im-plant: effect of compromised primary stability and fibrin adhesive TEA, *Dental Materials*, v. 30, n.S, p. e-145, Mar. 2014.
8. MACHADO, A. R.; COELHO, R. T.; ABRÃO, A. M.; DA SILVA, M. B. *Teoria da usinagem dos materiais*, 3 ed., São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2015.
9. PONSONNET, L. *et al.* Effect of surface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel–titanium substrates. *Materials Science and Engineering: C*, v. 21, n.1-2, p. 157-165, Set. 2002.
10. PONSONNET, L. *et al.* Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior. *Materials Science and Engineering: C*, v.23, n.4, p. 551-560, Jun. 2003.
11. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM F 136: Standard Specification for Wrought Titanium-6Aluminum-4Vanadium ELI (Extra Low Interstitial) Alloy for Surgical Implant Applications. PA, 2021.
12. SANDVIK COROMANT. Manufacturing Tools & Machining Solutions, disponível em <<https://www.sandvik.coromant.com/pt-pt/products/pages/productdetails.aspx?c=R123E2-0200-0502-CM%202135>>, acessado em ago., de 2022.
13. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR ISO 4288: Especificações geométricas de produto (GPS) - Rugosidade: Método do perfil - Regras e procedimentos para avaliação de rugosidade. Rio de Janeiro, 2008.
14. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR ISO 1302: Especificações geométricas de produto (GPS) - Indicação da textura da superfície na documentação técnica do produto. Rio de Janeiro, 2002.

## **ANALYSIS OF THE CORRELATION BETWEEN ROUGHNESS AND CELL VIABILITY IN TITANIUM ALLOYS.**

### ***ABSTRACT***

*The cell behavior exhibits an intimate relationship with the surface of material, and the roughness characterization is an important way to understand the viability of a biocomponent. This work involves the surface characterization of two samples of Ti-6Al-4V ELI titanium alloy that were machined with different feed rates, regarding the arithmetic mean roughness ( $R_a$ ), skewness ( $R_{kv}$ ) and kurtosis ( $R_{ku}$ ) and the feasibility analysis of FHH-1 fibroblasts in cellular assays. As expected, a sample machined at high feed showed higher mean roughness than the one at lower feed. Regarding cellular behavior, although still inconclusive, it may be inferred that surface machined with lower feed and so lower  $R_a$  showed better performance, which is in accordance with the literature.*

***Keywords:*** *biocompatibility, machining, surface integrity*