

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais

PPGE3M

**ÓRTESE GRAMPO TIPO JUDET EM NiTi PARA TÓRAX INSTÁVEL:
INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO SUPERFICIAL**

Denis Jardim Villarinho

Tese para obtenção do grau de Doutor em Engenharia

Porto Alegre - RS

2013

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais

PPGE3M

**ÓRTESE GRAMPO TIPO JUDET EM NiTi PARA TÓRAX INSTÁVEL:
INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO SUPERFICIAL**

Denis Jardim Villarinho

M. Sc. Engenheiro Mecânico

Trabalho realizado no âmbito da Escola de Engenharia da UFRGS, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Engenharia.

Área de concentração: Processos de Fabricação.

Porto Alegre – RS

2013

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do grau de Doutor em Engenharia, área de concentração processos de fabricação e aprovada em sua forma final, pelo orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Lírío Schaeffer.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Mauricio G. Saueressig. HCPA – FAMED (UFRGS).

Prof. Dr. Carlos Thadeu S. Cerski. HCPA– FAMED (UFRGS).

Profa. Dr^a. Célia de Fraga Malfatti. LAPEC – (UFRGS).

Profa. Dr^a. Claudia Trindade Oliveira. ICET - (FEEVALE).

Prof. Dr. Claudemiro Bolfarini. DEMa – (UFSCar)

Prof. Dr. Telmo Roberto Strohaecker

Coordenador do PPGE3M

Dedico este trabalho à minha esposa

Conceição e aos meus filhos Dennis

Daniel e Lauren.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, à minha esposa Maria da Conceição, aos meus filhos Dennis, Daniel e Lauren pelo incentivo, motivação constante e apoio em todos os momentos.

Agradeço ao Professor Dr. Lírio Schaeffer pela confiança, pela oportunidade e orientação em cada etapa do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Prof. Dr^a. Célia Malfatti do LAPEC, UFRGS, pelo acompanhamento no desenvolvimento da caracterização de superfície, uma das fases fundamentais dessa pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski, Famed/UFRGS pelos preciosos depoimentos e orientação médica em citologia e histologia.

Agradeço à Prof. Dr^a. Úrsula Matte - HCPA- UFRGS pelas análises de adesão e viabilidade de células sobre as amostras.

Agradeço ao Prof. Dr. Amarílio Vieira de Macedo Neto - Cirurgião torácico do HCPA pelo apoio e incentivo na pesquisa.

Agradeço ao Dr. Carlos Raimundo Frick Ferreira - C.T. UFRGS, pelo apoio e incentivo a pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Newton Fuentesfria pelo apoio e incentivo a pesquisa.

Agradeço ao engenheiro Daniel Neumann Villarinho pelo apoio nas pesquisas e ensaios.

Agradeço ao futuro engenheiro Juliano Rodrigues Günthner pelo auxílio nos recursos computacionais.

Agradeço a todos os colegas do LdTM e do LAPEC, em especial, Fernanda Albrecht, Leonardo Marasca, Stephane Nascimento, Luciane Taís Fuhr e Alana Witt pelo auxílio nas práticas de tratamento térmico e superfícies.

Agradeço a IMER Metalúrgica pelo apoio na preparação das amostras.

Agradeço aos mecânicos ferramenteiros Willie Weber e Willie Weber Junior pela disponibilidade em fabricar os moldes necessários à pesquisa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Histórico das Ligas Memória de Forma (LMF) e Conceito Geral.....	4
3.2 Conceitos Básicos do Efeito Memória de Forma e Superelasticidade.....	6
3.3 Estrutura Atômica dos Materiais.....	7
3.4 Transformações Martensítico-Termoelásticas	8
3.5 O Efeito Memória de Forma e a Superelasticidade	9
3.5.1 Memória de Forma	9
3.5.2 Superelasticidade	11
3.5.3 Ferro-Elasticidade.....	12
3.5.4 Efeito Memória de Forma de Uma Via (One-Way)	12
3.5.5 Temperatura de Transição nas Ligas Com Memória de Forma	12
3.5.6 As Temperaturas de Transformações de Fases.....	13
3.5.7 Diagrama de Fases do NiTi	14
3.5.8 Especificação do NiTi.....	15
3.5.9 Os Ossos no Corpo Humano, Conceituação de Ossos, Órteses, Trauma Torácico, Osteossíntese.....	15
3.6 Trauma Torácico	17
3.7 Grampos de Judet.....	19
3.8 Grampos de Sanchez-LLoret.....	20
3.9 Aplicação Médica – Fratura Costal e o Parênquima Pulmonar	21
3.9.1 Tórax Instável	21
3.10 Acessórios Para Inclusão de Grampos em Aço Inoxidável	22
3.11 Inserção de Grampos em NiTi para Estabilização de Ossos no Corpo Humano ..	23
3.11.1 Superelástico (SE)	23
3.11.2 Temperatura corporal (BT).....	23
3.11.3 Termo Ativado (HA)	24
3.12 Inclusão do Grampo de Judet.....	25
3.13 Biomateriais, Biocompatibilidade do NiTi	26
3.13.1 Biomateriais.....	26
3.14 Classificação dos Biomateriais	26
3.15 Biomateriais Segundo Resposta dos Tecidos.....	27

3.27 Esterilização em Vapor Saturado e Óxido de Etileno.....	49
3.28 Radiação Gama	50
3.29 Adesão Celular na Superfície Oxidada da liga NiTi.....	50
3.30 Teste de Citotoxicidade.....	50
3.30.1 Princípio.....	50
3.30.2 Amostra.....	51
3.30.3 Reagentes/soluções/suspensão celular.....	51
3.30.4 Procedimento	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Grampos em NiTi para Tórax Instável.....	53
4.2 Preparação do Substrato para a Caracterização das Superfícies	54
4.2.1 Corte das tiras em equipamento EDM.....	54
4.2.2 Tratamento Térmico	55
4.2.3 Ciclo de Tratamento Térmico empregado para memorizar forma no grampo tipo Judet.....	55
4.2.4 Tratamento Superficial por Anodização.....	57
4.2.5 Lavagem Ultrassônica das tiras após tratamento superficial (tratamento térmico ou anodização) para posterior teste de crescimento celular e toxicidade	58
4.3 Caracterizações das amostras.....	59
4.3.1 DSC – Calorimetria diferencial de varredura	59
4.3.2 RBS (Espectrometria de Retroespalhamento de Rutherford).....	59
4.3.3 Difração de Raio X	59
4.3.4 Espectroscopia Raman.....	59
4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	60
4.3.6 EDS – Espectrografia por dispersão de energia (Energy Dispersion Spectrography)	60
4.3.7 Microscopia de Força Atômica (Atomic Force Microscopy - AFM).....	60
4.3.8 Perfilometria de Contato.....	60
4.3.9 Molhabilidade	61
4.4 Cultura de Células	61
4.4.1 Lavagem	62
4.4.2 Dessecação.....	62
4.4.3 Metalização.....	62

4.4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Superfícies Cultivadas com Fibroblastos	63
4.4.5	Viabilidade Celular: ensaio MTT	63
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
5.1	Grampos tipo Judet: projeto	64
5.2	Tratamento Superficial.....	65
5.3	Tratamentos Superficiais obtido por Tratamento Térmico	66
5.4	Tratamento Superficial por Anodização	67
5.5	Composição química superficial das amostras tratadas	67
5.5.1	Espectroscopia de retroespalhamento de Rutherford (Rutherford Backscattering Spectroscopy -RBS)	67
5.5.2	Difração de Raio-X (X-Ray Diffraction-XRD).....	70
5.5.3	Espectroscopia Raman para amostras anodizada, como-recebida, oxidação azul e oxidação dourada.....	71
5.5.4	Conclusão parcial.....	73
5.6	Morfologia das amostras tratadas.....	74
5.6.1	Avaliação da rugosidade em escala micrométrica por perfilometria de contato	74
5.6.2	Avaliação da Rugosidade em escala nanométrica por Microscopia de Força Atômica (Atomic Force Microscopy -AFM)	75
5.6.3	Molhabilidade	78
5.6.4	Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura	79
5.6.5	Pulsção Cíclica: Teste de Dobramento	84
5.6.6	Conclusão parcial.....	85
5.7	Culturas de Células	86
5.7.1	Cultura celular	86
5.7.2	Viabilidade Celular	88
7.	CONCLUSÕES.....	90
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efeito Memória de Forma (EMF).....	6
Figura 2: Mecanismos de memória de forma do NiTi [40].....	10
Figura 3: Gráfico tensão-deformação da liga NiTi a 10°C. Associado ao esquema de mudanças micro-estruturais [41].	11
Figura 4: Diagrama de fase binário do NiTi [48].....	14
Figura 5: Fisiologia do tórax paradoxal [58].....	18
Figura 6: Tipos de fraturas [59].....	19
Figura 7: Arcabouço torácico mostrando as costelas e as vértebras [60].....	19
Figura 8: Trauma Torácico. Caso clínico: reconstrução de tomografia computadorizada com ênfase no arcabouço ósseo torácico demonstrando múltiplas osteossínteses costais, fixadas por grampos de Judet [61].	20
Figura 9: Grampo de Sanchez-Lloret [62].....	20
Figura 10: Aplicação do grampo de Judet em aço inoxidável [59].....	22
Figura 11: Modelos de pinças [59].....	23
Figura 12: Estabilização de tórax através da inclusão dos grampos de Judet em animal [69]. 25	
Figura 13: Fluxograma dos Biomateriais [73].	27
Figura 14: Célula humana [96].....	38
Figura 15: Ângulo de contato/molhabilidade [110].	45
Figura 16: Representação hidrofóbica e hidrofílica. (A) hidrofóbica; (B) hidrofílica [112].	46
Figura 17: Representação esquemática da energia de superfície [103].....	46
Figura 18: Princípio da Técnica MTT [124].	50
Figura 19: Ciclo de cultura [124].	52
Figura 20: Ciclo operacional do teste MTT [124].....	52
Figura 21: Diagrama de blocos do ciclo operacional.	53
Figura 22: Fluxograma do processo de corte de tiras em EDM.	54
Figura 23: Gases refrigerantes, tetrafluoretano 134 a e pentafluoretano 404a.....	56
Figura 24: Grampos cortados e molde de forno.	56
Figura 25: Desenho do molde de forno. (a) Desenho do molde de forno fechado com grampo e (b) em detalhe aberto com grampo.	56

Figura 26: Fluxograma da lavagem ultrassônica.....	58
Figura 27: Grampo idealizado por Judet.	64
Figura 28: Grampo tipo Judet mostrando as garras assimétricas.	64
Figura 29: Desenho do grampo tipo Judet, dimensões em mm.....	65
Figura 30: Grampo tipo Judet opcional com corpo longo e furos.....	65
Figura 31: Desenho do grampo tipo Judet opcional.....	65
Figura 32: Análise DSC da amostra como-recebida.	66
Figura 33: Grampos e tiras cortados em máquina EDM – eletro-erosão a fio.....	66
Figura 34: Análise de RBS para a amostra como-recebida.....	68
Figura 35: Gráfico de RBS para as amostras. (a) AN10; (b) AN30.....	69
Figura 36: Resultados de RBS para amostras tratadas termicamente (amostras oxidação dourada e azul).....	69
Figura 37: Difração de Raio-X, incidência rasante (5°) sobre as amostras.....	71
Figura 38: Difração de Raio-X da amostra anodizada, incidência rasante (5°).	71
Figura 39: Espectroscopia Raman para as amostras azul, dourada e como-recebida.	72
Figura 40: Espectroscopia Raman para amostra anodizada.	73
Figura 41: Imagens obtidas por perfilometria de contato. (a) amostra oxidação azul; (b) amostra oxidação dourada; (c) amostra como-recebida.	75
Figura 42: Imagens obtidas por perfilometria de contato. (a) AN10; (b) AN30.....	75
Figura 43: Imagens obtidas por AFM 2D. (a) Amostra oxidação azul; (b) Amostra oxidação dourada; (c) Amostra como-recebida. d) anodizada AN10.....	77
Figura 44: Imagens por AFM 3D. (a) Amostra oxidação azul; (b) Amostra oxidação dourada; (c) Amostra como-recebida. d) anodizada AN10.....	77
Figura 45: Micrografia obtida por MEV para amostra de NiTi como-recebida. (a) baixa ampliação 1000x; (b) alta ampliação 10.000x.....	79
Figura 46: Micrografia da amostra AN10.	81
Figura 47: Micrografia da amostra AN30.	81
Figura 48: Espectro de EDS da partícula que rompe a camada de óxido na amostra AN30.	81
Figura 49: Morfologia da superfície das amostras: (a) tratamento superficial oxidação dourada (tratamento térmico a 530°C por 6 min). (b) tratamento superficial oxidação azul (tratamento térmico a 570°C por 20 min).	82
Figura 50: MEV das imagens das secções transversais. (a) amostra anodizada AN10 (b) amostra oxidação azul (c) amostra oxidação dourada.	83

Figura 51: Imagens obtidas por MEV após o teste de pulsação cíclica. (a) amostra oxidação azul; (b) amostra oxidação dourada e (c) amostra anodizada AN10..... 85

Figura 52: Imagens em MEV após cultura de células. (a) típica célula apoptótica (b) célula saudável. 87

Figura 53: Imagens em MEV após cultura de células. (a) como-recebida; (b) anodizada AN10; (c) oxidação azul; (d) oxidação dourada..... 88

Figura 54: Percentual de viabilidade de crescimento celular. 89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Biomateriais segundo resposta dos tecidos [72].	28
Tabela 2: Propriedades mecânicas do Nitinol [35].	28
Tabela 3: Propriedades mecânicas do osso cortical e trabecular [35].	28
Tabela 4: Média de rugosidade (Ra). Resultado de testes em diferentes amostras [14].	33
Tabela 5: Espessura de óxidos nas superfícies das amostras ($1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$) [14].	33
Tabela 6: Metodologia para teste de MTT (Metiltetrazolium).	51
Tabela 7: Amostras.	57
Tabela 8: Descrição das amostras estudadas na anodização.	58
Tabela 9: Sistemas pesquisados.	61
Tabela 10: Fixação.	62
Tabela 11: Desidratação.	62
Tabela 12: Amostras tratadas e como recebida.	67
Tabela 13: Medidas de rugosidade por perfilometria de contato.	74
Tabela 14: Rugosidade pela técnica AFM.	76
Tabela 15: Valores do ângulo de contato (solução PBS).	79
Tabela 16: Espessuras de camadas de óxido.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AES	<i>Auger Electron Spectroscopy.</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy.</i>
AN	Anodizado.
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials.</i>
AP	<i>Adhesion Power</i> , Força de Adesão.
BFR	<i>Bend and Free Recovery</i> – Dobra e Livre Recuperação.
BT	<i>Body Temperature</i> (Temperatura Corporal).
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i> (Fibroblasto de Hamster).
CCC	Cúbico de Corpo Centrado.
CME	Centro de Materiais e Esterilização.
CMS	Célula, Matriz-Extracelular, Superfície.
Cp	Comercialmente Puro.
DSC	<i>Differential Scanning Calorimeter</i> . Calorímetro Diferencial de varredura.
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (meio de cultura de células).
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EA	Eletropolido e anodizado.
EMF	Efeito Memória de Forma.
EP	Eletropolida.
EDM	<i>Electric Discharge Machining</i> – Eletro-Erosão a Fio.
EDS	<i>Energy Dispersion Spectrography</i> – Espectrografia por Dispersão de Energia.
FN	Fibronectina.
FAMED	Faculdade de Medicina da UFRGS.
FEEVALE	Universidade Feevale.
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
H A	<i>Heat Activated</i> , Termoativada.
IME	Instituto Militar de Engenharia.
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.
ISO	International Standard Organization.
L	Lixada.
LMF	Liga Memória de Forma.
LABIOMAT	Laboratório de Biomateriais da UFRGS.
LAPEC	Laboratório de Pesquisa em Corrosão da UFRGS.

LAPOL	Laboratório de Polímeros da UFRGS.
LEC	Líquido Extra Celular.
LdTM	Laboratório de Transformação Mecânica da UFRGS.
MMG	Memory-Metalle – GmbH (Atual Memry GmbH).
MEC	Matriz Extra Celular.
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura.
M.O.	Microscópio Óptico.
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> , Imagem por Ressonância Magnética.
MTT	Brometo de 3 - [4,5-dimetiltiazol-2-il] - 2,5 - difenil tetrazólio.
NOL	<i>Naval Ordnance Laboratory</i> – Laboratório de Artilharia Naval.
NDC	<i>Nitinol Devices Componentes</i> – Freemont – Ca. U.S.A.
Nitinol	Nome comercial: Níquel-Titânio <i>Naval Ordnance Laboratory</i> .
PET	Poliéster.
NiTi	Níquel-titânio.
P	Polida.
P.A	Pureza Analítica.
PI	Patente de Invenção.
PP	Polipropileno.
PPTFE	Plasma Polimerizado Tetrafluoretano.
RBS	<i>Rutherford Backscattering Spectroscopy</i> .
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i> .
SFB	Soro Fetal Bovino.
SE	<i>Super-Elastic</i> (Superelástica).
SPM	<i>Scanning Probe Microscopy</i> .
TCP	Fosfato Tricálcico.
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais.
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LISTA DE SÍMBOLOS

As	Temperatura em que ocorre o início da transformação austenítica durante o aquecimento da liga (°C).
Af	Temperatura na qual ocorre o final da transformação austenítica durante o aquecimento da liga (°C).
AN	Anodizado
DE	Nível de energia (eV).
E	Módulo de Young ou módulo de elasticidade (GPa).
G	Energia Livre de Gibbs (J).
Gy	Gray – Quantidade de energia ionizante.
ΔH	Variação da entalpia de formação.
Ht	Histerese térmica (°C).
Md	Temperatura máxima em que ocorre a transformação martensítica por tensão (°C).
MF	Temperatura na qual ocorre o final da transformação martensítica durante o processo de resfriamento da liga (°C).
Ms	Temperatura na qual ocorre o início da transformação martensítica durante o processo de resfriamento da liga (°C).
Ra	Rugosidade média (μm).
Rf	Temperatura na qual ocorre o final da transformação da fase R durante o aquecimento da liga.
Rms	Médias quadráticas da rugosidade (variância) (μm).
Rs	Temperatura na qual ocorre o início da transformação da fase R durante o aquecimento da liga (°C).
Rv	Profundidade máxima do vale até a linha média (μm).
Rz	Distância média entre os cinco picos máximos e os cinco vales máximos (μm).
R'f	Temperatura em que ocorre o final da transformação, da fase R durante o resfriamento da liga (°C).
R's	Temperatura em que ocorre o início da transformação da fase R durante o resfriamento da liga (°C).
T	Temperatura (°C).
α'	Fase martensítica.
γ	Fase austenítica.
Δ	Delta, dimensão fractal.

- σ_e Tensão de escoamento (MPa).
 σ_r Tensão de ruptura (MPa).
 σ_m Tensão máxima (MPa).
 σ_t Tensão de Tração (MPa).
- ϵ Deformação relativa (%).

RESUMO

O emprego de ligas de NiTi, às quais possuem memória de forma e superelasticidade apresentam-se como uma possível alternativa aos grampos de Judet em aço inoxidável 316L utilizados em implantes. Assim, foi redesenhado o grampo tipo Judet com as garras espaçadas para atender à memória de forma. Contudo, na superfície de NiTi, o níquel pode dissolver-se mais facilmente que o titânio, pois seu óxido Ni_2O_3 não é estável. Sabe-se que o níquel é considerado tóxico quando em excesso por isso a sua liberação dentro do corpo humano deve ser evitada. Dessa forma, foram desenvolvidos processos de tratamentos superficiais visando diminuir a possibilidade de degradação e liberação de íons níquel para o organismo humano, rugosidades para melhor adesão e viabilidade de crescimento celular, e ainda que essa superfície não trincasse ou descamasse no dobramento. Para a caracterização das ligas de NiTi empregou-se análise por calorimetria diferencial de varredura para, assim, determinar as temperaturas de transformação de fases da liga. As superfícies tratadas termicamente e anodizadas foram avaliadas por espectroscopia de retro espalhamento de Rutherford, Difração de Raios-X, espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura, espectrometria por dispersão de energia, microscopia de força atômica, perfilometria de contato e monitoramento do ângulo de contato para a caracterização morfológica e química das mesmas. A adesão celular na superfície das amostras foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Após essas caracterizações foram selecionados sistemas que apresentaram morfologia e composição química adequada para a realização da cultura de células, avaliando, desse modo, a adesão celular, citotoxicidade e dobramento. Dessa forma, foram comparadas cinco superfícies: como-recebida, anodizadas AN10 e AN30, e com tratamento térmico (oxidação dourada e oxidação azul). Os resultados obtidos mostraram que as superfícies com oxidação dourada e azul apresentaram 80% e 75% de viabilidade de crescimento celular, entretanto a amostra com oxidação azul apresentou trincas na superfície após ensaio de dobramento. As superfícies anodizadas AN10 apresentaram 60% de viabilidade de crescimento celular, além disso, comparativamente aos demais sistemas estudados, essas amostras apresentaram-se mais hidrofílicas com maior rugosidade nanométrica menor rugosidade micrométrica e menor espessura de camada de óxido empobrecido em níquel, sendo essa a superfície com características mais promissoras para aplicação biomédica.

ABSTRACT

The use of NiTi alloys which have shape memory and superelasticity present as a possible alternative to staples Judet stainless steel 316 L used for implants. Once the clip has been redesigned Judet type with claws spaced to suit the shape memory. However, the surface of untreated NiTi, nickel may dissolve more readily than titanium as its Ni₂O₃ oxide is not stable. It is known that nickel is considered to be toxic when present in excess and its release in the human body should be avoided. Therefore processes have been developed for surface treatments in order to decrease the possibility of degradation and release of nickel ions by the human body, wrinkles improved adhesion to cell growth and viability and that this surface not cracks, flaking or folding. For the characterization of NiTi alloy was employed by Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis in order to determine the phase transformation temperatures of the alloy. The heat treated and anodized surfaces were examined by spectroscopy backscattering Rutherford (RBS), X-Ray Diffraction, Raman Spectroscopy) scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectrometry (EDS), atomic force microscopy (AFM), contact profilometry and monitoring of the contact angle for the morphological and chemical characterization of the same. Cell adhesion on the surface of the samples was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). After these characterizations were selected systems which showed morphology and chemical composition suitable for realization of cell cultures, and thus evaluate cell adhesion, folding and cytotoxicity. Thus five surfaces were compared: as-received, anodized AN10, AN30, golden and blue oxidation, where oxidation golden showed 80% and 75% viability of cellular growth, however the sample oxidation blue showed surface cracks after testing folding. The anodized surfaces AN10 revealed 60% viability cell growth, in addition, compared to other systems studied, the samples were more hydrophilic surface roughness with greater roughness smaller micrometer and nanometer thick layer of low-depleted nickel oxide, which is the surface features more promising for biomedical application.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de biomateriais é um dos campos de pesquisa e desenvolvimento que mais tem chamado à atenção de cientistas nos últimos anos. Tal interesse vê-se motivado por fatores como o desempenho dos biomateriais usados atualmente, e a ampliação progressiva do tempo de vida médio da população tem gerado a necessidade de desenvolvimento de novos biomateriais com propriedades superiores, capazes de cumprir suas funções por períodos de tempo mais longos.

Quanto à saúde e conforto da população, o desenvolvimento de biomateriais mais eficientes e de métodos de aplicação e escolha mais controlados, levarão a um aumento no padrão de vida da população, já que reduzirão o número de cirurgias de revisão e favorecerão o reenquadramento de pacientes com melhoria da qualidade de vida.

Com referência aos aspectos econômicos sabe-se que mais de cinco milhões de implantes são requeridos, anualmente, nos Estados Unidos e mais de três milhões, na Europa [1].

No Brasil do ponto de vista social: além da necessidade de melhoria da saúde geral dos brasileiros, grande parte dos biomateriais usados é importada e acaba por gerar gastos elevados, por parte da Saúde Pública. Desta forma, observa-se uma enorme necessidade de desenvolvimento científico e tecnológico na área de biomateriais como forma de atender às necessidades de melhoria da saúde geral e de redução de custos dos materiais envolvidos.

Implantes para osteossíntese costal do tórax instável são normalmente confeccionados em aço inoxidável AISI 316L. No entanto, durante o procedimento cirúrgico, o processo de inclusão do implante exige esforço físico do cirurgião torácico e uso de instrumentos que podem causar danos à superfície do implante, riscando a camada passivada, reduzindo a resistência à corrosão, o que, conseqüentemente, poderia provocar reação inflamatória mais intensa.

Em estudos anteriores, realizados no LdTM, foi desenvolvido o grampo de Judet em Nitinol, tendo sido esse processo patenteado [2, 3]. A vantagem do emprego dessa liga para a confecção desse tipo de órtese está na facilidade de manuseio durante o procedimento cirúrgico, eliminando a necessidade do uso de instrumentos para moldar o implante sobre a fratura. No presente trabalho, o grampo foi redesenhado para se adequar ao efeito memória de forma,

sendo chamado de grampo tipo Judet. O projeto biomecânico da órtese ou prótese deve adequar-se perfeitamente à sua finalidade para não comprometer a funcionalidade dos demais órgãos adjacentes, facilitando o procedimento cirúrgico e possibilitando sua retirada com intervenção cirúrgica. Essa é uma especificação do ministério da saúde [4], embora, normalmente nem todas as órteses e próteses permitam a sua remoção após implante. Além disso, esses implantes não devem se deslocar ou provocar fibrose excessiva.

O NiTi, liga composta de níquel e titânio pode ser conceituado como composto intermetálico com memória de forma, binária, bifásica, biocompatível, aproximadamente, equiatômica classificada como material aloplástico nos biomateriais e utilizado na segunda e terceira geração destes materiais, principalmente, na odontologia em fios ortodônticos e na ortopedia em grampos para ossos. No entanto, quando em contato com eletrólito do organismo pode ocorrer a difusão de níquel em concentrações que ocasionem alterações biológicas, considerando que o níquel acima de determinadas concentrações pode ser carcinogênico.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de promover a formação de uma barreira à difusão do níquel para o organismo [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. No entanto esse tema é extremamente complexo, pois é preciso considerar que os diferentes tipos de células, que podem estar em contato com o implante, não possuem o mesmo comportamento relacionado à adesão e o crescimento celular. Isso justifica a necessidade de intensos estudos nesta área buscando o conhecimento do comportamento de tipos específicos de células em superfícies com propriedades morfológicas, químicas estruturais controladas. Ao mesmo tempo a complexidade desse tema, é o que justifica o fato de que os resultados dos estudos obtidos até o momento não apontam para uma única direção.

Neste contexto, no presente trabalho foram desenvolvidos tratamentos superficiais com o objetivo de aumentar a adesão célula-implante, o crescimento celular e a viabilidade celular. Para isso foram empregados processos com redução de impacto ambiental: tratamentos térmicos (oxidação azul e oxidação dourada) e tratamento eletroquímico de anodização em solução isenta de fluoreto.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi o desenvolvimento de superfícies para grampos do tipo JUDET em NiTi, para osteossíntese costal do tórax instável, utilizando o efeito, *one way*, uma via da memória de forma.

Objetivos específicos:

- a) Anodizar/tratar termicamente → b) controlar rugosidade → c) controlar molhabilidade através do ângulo de contato → d) avaliar camada de óxido quanto aos movimentos cíclicos da memória de forma (fissuras e descamação) → e) teste citotóxico.
- Obter camada de óxido de titânio nas superfícies através de tratamento eletroquímico e térmico para diminuir ou eliminar a difusão dos íons níquel para o organismo, pois é sabido que o níquel é cancerígeno [6, 13, 14] e as ligas NiTi médicas possuem 55,5% Ni em peso. O material implantado não deve produzir qualquer resposta biológica adversa, local ou sistêmica e, também, não sofrer degradação quando em contato com os demais tecidos. Os fluidos corporais são altamente corrosivos e os metais podem ser atacados após inclusão no corpo humano. A corrosão pode induzir a citotoxicidade, histotoxicidade, hipersensibilidade e imunogenicidade, podendo provocar distúrbios na função de alguns órgãos.
- Controlar a rugosidade das superfícies visando o favorecimento da adesão e o crescimento celular. É sabido que determinados tipos de células tem o crescimento e adesão favorecidos com o aumento da rugosidade nanométrica e diminuição da rugosidade micrométrica [15]. Contudo, fibroblastos preferem superfície com menor rugosidade micrométrica que os osteoblastos [16, 17].
- Monitorar a molhabilidade das superfícies desenvolvidas. Estudos indicam superfícies hidrofílicas favorecem a adesão e o crescimento celular [18, 19].
- Avaliar o comportamento do óxido formado na superfície quanto ao acompanhamento da deformação do substrato. As superfícies desenvolvidas devem atender ao efeito memória de forma do substrato de NiTi sem trincar ou descamar. Relatos na literatura mencionam que o óxido obtido tem caráter cerâmico e devido à baixa plasticidade podem trincar ou descamar [20].
- Avaliar, através de teste citotóxico, as superfícies com tratamento térmico e anodização comparativamente à como-recebida, quanto ao crescimento e viabilidade celular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico das Ligas Memória de Forma (LMF) e Conceito Geral

As ligas memória de forma são ligas metálicas que exibem as propriedades de “pseudo-elasticidade” e “efeito memória de forma”. Arne Olander observou essas propriedades em 1938 [21]. Chang e Read observaram que uma liga de ouro e cobre retornava à sua forma anterior depois de deformada e aquecida. A partir daí, começaram as pesquisas e o largo uso das ligas incluindo NiTi, CuZnAl, CuAlNi e outras.

O primeiro esforço para explorar o NiTi como implante foi feito por Johnson e Alicandri em 1968 [22]. O Uso do NiTi como aplicação médica foi reportado, primeiramente, na década de 1970 [23].

Nos anos 80, foi dado maior apoio às aplicações ortopédicas e ortodônticas e somente em 1995 foi aplicado o primeiro Stent [24]. Consta na literatura, que foi o pesquisador metalurgista William F. Buehler, no Laboratório de Artilharia Naval da Marinha Americana (Naval Ordnance Laboratory), quem desenvolveu uma liga metálica, com memória de forma de composição, aproximadamente, equiatômica de níquel e titânio, em 1965, daí o acrônimo Nitinol [25].

Muitas destas ligas têm a notável propriedade de “lembrar” suas formas anteriores. Esta propriedade “inteligente” é o resultado de estas ligas promoverem sua mudança de fase em resposta à mudança de temperatura ou aplicação de tensão mecânica. De acordo com pesquisas da University of Wisconsin-Madison, essa temperatura em que há mudança de fase está relacionada à proporção de átomos de NiTi, aproximadamente 1:1.

O efeito memória de forma poderia ser definido como a capacidade de certos materiais, após ter sofrido uma deformação mecânica no estado martensítico, voltarem ao estado original austenítico através de aquecimento. Fisicamente, a memória de forma está relacionada com a transformação martensítica cristalograficamente reversível. Suas propriedades funcionais são:

- EMF, efeito memória de forma de uma via (somente aquecimento, *one-way*, onde a mudança de forma ocorre no sentido martensita para austenita).
- EMF, efeito memória de forma de duas vias (aquecimento e resfriamento, *two-ways*).

Superelasticidade (chamada pseudo-elasticidade): capacidade da liga de sofrer grandes deformações sem sair do regime elástico [26].

A estrutura cristalina, encontrada acima da temperatura mudança de fase, Af (temperatura final de austenitização) tem a forma CCC(cúbica de corpo centrado), que é chamada austenítica e a estrutura encontrada abaixo da temperatura mudança de fase, Mf (temperatura final de transformação martensítica) tem a forma menos simétrica, chamada martensítica com estrutura monoclinica. Na fase martensítica o material é elástico, enquanto que na fase austenítica o material é mais rígido [27].

As ligas de NiTi têm composição química binária, inter-metálica e equiatômica (49% Ti – 55,5% Ni), com densidade 6,9 g/cm³, ponto de fusão 1310°C.

Além das propriedades acima se pode citar a alta resistência à fadiga, baixo módulo de elasticidade (semelhante ao módulo de elasticidade do osso) a impermeabilidade e efeito amortecedor, qualidades úteis nos implantes cirúrgicos ortopédicos [28].

As aplicações do NiTi incluem diversas áreas, desde instrumentos cirúrgicos, tais como pinças, cateteres, até implantes permanentes, incluindo implantes dentro do sistema circulatório.

A indústria de equipamentos médicos tem desenvolvido diversos produtos e equipamentos, tais como stents, fios ortodônticos, próteses de fixação de ossos, Simon Nitinol Filter™, Mitek Anchor®, para desobstrução de artérias e, outros, usando ligas de NiTi devido à sua biocompatibilidade e superelasticidade. A biocompatibilidade, resistência à corrosão, excelente citocompatibilidade, tornam possíveis as aplicações do NiTi no corpo humano. O Níquel em NiTi é, quimicamente, ligado ao titânio em vínculo inter-metálico forte (20 a 200 kcal/mol, força em ligações metálicas), logo o risco de reação alérgica mesmo em pacientes com pouca tolerância ao níquel é extremamente baixa [29]. Alto conteúdo de níquel nessas ligas não implica alta liberação de níquel no corpo. Entretanto o conhecimento da liberação de níquel evoluiu. Estudos de laboratório mostraram que ligas preparadas (com tratamento superficial) indicaram reduções de nível de níquel quase indetectáveis após 10-14 dias de exposição em soluções fisiológicas. Por outro lado, recentemente, verificaram-se em ligas comercializadas e aplicadas como-recebidas (sem qualquer tratamento superficial), crescentes níveis de liberação de níquel, com exposição até seis meses [20].

3.2 Conceitos Básicos do Efeito Memória de Forma e Superelasticidade

A memória de forma e a superelasticidade das ligas NiTi resultam da mudança de fase austenítica para martensítica, e, martensítica para austenítica, que ocorre na rede cristalina influenciada por variações na temperatura e ou tensões, às quais a liga está submetida.

No diagrama de Hooke a maioria dos metais mostram um comportamento elástico causado diretamente por uma força aplicada e, ao se retirar essa força, antes de seu valor máximo de escoamento, a deformação é totalmente recuperada ou quase toda, dependendo de sua composição química. Acima desse limite máximo de escoamento a força provoca deformação permanente que, na maioria dos materiais, não pode ser recuperada e essa deformação é a deformação plástica.

Nas ligas memória de forma e, particularmente, nas ligas NiTi o corpo é capaz de recuperar completamente sua forma original, por aquecimento mostrado na Figura 1, sendo a temperatura da mudança de forma, característica da composição química.

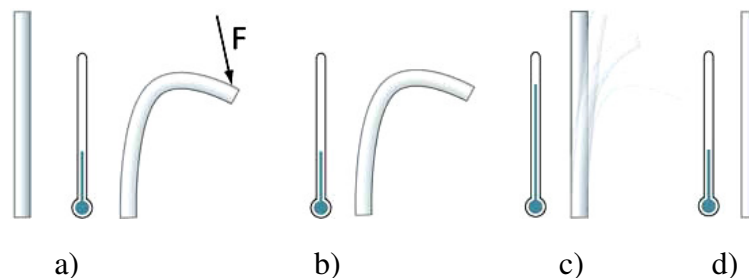


Figura 1: Efeito Memória de Forma (EMF).

a) o corpo é resfriado e deformado b) o corpo permanece deformado, enquanto resfriado c) o corpo é aquecido e, então, retorna à forma inicial antes do resfriamento d) nesta forma o corpo é resfriado e permanece na forma inicial para ser deformado novamente. O corpo é deformado plasticamente, abaixo de certa temperatura e ao ser aquecido recupera totalmente sua forma; esse é típico efeito memória de forma uma via (EMF) [24].

Entre as ligas de memória de forma, somente as ligas NiTi apresentam o efeito de memória de forma total, isto é, retornam totalmente à forma original memorizada [30]. A superelasticidade e o efeito de memória de forma são dois aspectos do mesmo efeito, ambos resultantes de um tipo peculiar de transformação cristalina, denominada transformação martensítico-termoelástica [24].

Transformações martensítico-termoelásticas são transformações de estado sólido e a causa dessas transformações ocorre devido à diferença de energia livre, entre as estruturas constituintes envolvidas no processo, o que induz modificações nas ligações químicas, tor-

nando as transformações de fase de caráter essencialmente cristalográfico [31]. As transformações martensíticas são os fatores do efeito de memória de forma [32].

3.3 Estrutura Cristalina dos Materiais

Alotropia: a existência de um dado metal em duas ou mais formas estáveis, mas com diferentes estruturas cristalinas, dependente das condições de temperatura ou pressão, chama-se alotropia. A essência da alotropia é a transformação da fase cristalina em outra [33].

Algumas propriedades mecânicas de um material, como dureza, resistência mecânica e ductilidade são consequências, numa primeira análise, do arranjo cristalino e do tipo de célula unitária. Quando mais de um tipo de célula unitária está presente em um mesmo material, diz-se que o material apresenta polimorfismo e cada estrutura é uma fase cristalina. A fase cristalina é a região do cristal, que apresenta a mesma estrutura cristalina e, por isso, guarda propriedades físicas semelhantes.

Mudança de fase: ao fornecer energia aos átomos, por exemplo, na forma de calor, a rede é capaz de se modificar e, por consequência, mudar sua célula unitária, diz-se que nesse caso ocorre a mudança de fase.

Na liga NiTi existem duas fases cristalinas principais, presentes de acordo com a temperatura do material: a austenita e a martensita. Ainda há a fase chamada R, que aparece com mais frequência no resfriamento.

- Austenita: CCC cúbico de corpo centrado ou B2, onde os átomos ocupam as posições dos vértices e do centro do cubo.
- Martensita: nas ligas NiTi é monoclinica, que é uma distorção da estrutura chamada B19, em que o maior lado é inclinado em relação à base da célula [34]. A célula unitária é um paralelepípedo oblíquo com um ângulo oblíquo e lados desiguais [35].

A transformação martensítica na LMF: a transformação da austenita em martensita se inicia, quando a liga passa no resfriamento com temperatura crítica denominada M_s (*Martensite Start*) e se completa em M_f (*Martensite Finish*). Se houver alguma austenita que, por algum motivo, não conseguiu se transformar, chamar-se-á de austenita retida.

A transformação austenítica: transformação reversa, o sentido oposto, se inicia no aquecimento na temperatura A_s (*Austenite Start*) e termina em A_f (*Austenite Finish*) quando, então, o material é completamente austenítico.

Transformação de fase difusional: uma transformação de fase pode ser difusional, devido a um átomo ativado pelo calor percorrer longas distâncias dentro do cristal, decompondo-se numa fase e se recombinando em outra fase distante.

Transformação de fase não-difusional: os átomos não têm tempo para se recombinar e percorrem distâncias pequenas ou curto alcance.

A transformação martensítica é não-difusional.

3.4 Transformações Martensítico-Termoelásticas

O fato de que transformações martensíticas ocorrem em ligas de NiTi, pode ser comprovado por microscopia óptica, que revela o alívio superficial esperado, para esse tipo de transformação. Alguns autores [36] relataram o progressivo crescimento do alívio superficial à medida, que se resfria uma amostra de NiTi abaixo da temperatura M_s e seu subsequente desaparecimento, quando se aumenta a temperatura. Poder-se-ia observar como se intensifica o alívio superficial, ou seja, como a fase martensítica, que progressivamente se forma, altera a superfície da amostra, à medida que a temperatura é reduzida e como o efeito se reverte, indicando o desaparecimento da martensita, quando a temperatura é aumentada.

Outra maneira de explicar a transformação martensítica termoelástica seria: a transformação martensítica de fase, que origina o efeito memória de forma, tem caráter termo elástico. Durante essa transformação, o movimento da interface é controlado por um balanço local entre as forças químicas e não-químicas [37]. A força motriz (potencial químico) é a energia livre de Gibbs das fases austenita e martensita e as forças não-químicas são a energia de deformação elástica e a dissipação de energia, devido às resistências passivas ao movimento da interface. As forças não-químicas aparecem, quando ocorrem interações entre as interfaces e os defeitos cristalinos (precipitados, discordâncias cristalinas, lacunas e outros).

Avaliando a seqüência das diferentes contribuições de energia (dissipação irreversível de energia e armazenamento reversível de energia elástica), as curvas das transformações termo elásticas são caracterizadas por histerese de transformação, em temperatura ou tensão mecânica [21]. As transformações podem ser caracterizadas pelos termos térmicos e elásticos.

Para a temperatura abaixo do M_s , as plaquetas da martensita crescem à medida que a amostra é resfriada e, após alcançar certo tamanho, quando a soma do crescimento na energia livre termoquímica e o aumento na energia livre não-química (elástica e resistências passivas) se aproximam de certo valor mínimo, o crescimento é interrompido. O equilíbrio entre os efeitos térmico e elástico nos fornece a denominação “termo elasticidade” e a denominação de transformação martensítica termo elástica [37].

Quando esse equilíbrio térmico é quebrado, as plaquetas da martensita irão crescer ou contrair; por conseguinte, a estabilidade das fases apresenta forte dependência da temperatura. A fase estável é a que possui menor energia livre. As transformações martensíticas termo elásticas são, cristalograficamente, reversíveis, ao contrário, das transformações verificadas nos aços comerciais. É importante salientar que a transformação martensítica termo elástica das LMF pode ser fisicamente detectada por várias técnicas, BFR, DSC e resistividade elétrica em função da temperatura. Fase (R) é a fase intermediária tendo a distorção romboédrica da austenita cúbica.

Outra fase além da austenita e da martensita pode estar presente em certas ligas de Ni-Ti, dependendo do teor de níquel e do histórico térmico da liga. Essa fase é considerada fase intermediária entre a austenita e a martensita e apresenta célula unitária romboédrica, sendo por isso chamada de fase-R. Suas temperaturas de início e fim de transformação durante o resfriamento e aquecimento são denominadas respectivamente R_s , R_f , R'_s , R'_f [38]. Apesar de contribuir com pequeno ganho de memória de forma, ela é praticamente ignorada em ligas comerciais.

3.5 O Efeito Memória de Forma e a Superelasticidade

3.5.1 Memória de Forma

O termo memória de forma refere-se à habilidade de certos materiais de “lembrar” um determinado formato, mesmo que deformações severas lhe sejam aplicadas: uma vez que o NiTi, deformado a baixas temperaturas, permanecerá com o novo formato, até que seja aquecido e com isso retornará espontaneamente à sua forma original. Esse efeito está vinculado a duas fases, especificamente, a austenita e a martensita [39].

Na fase austenítica há a forma desejada. Esfriando-se o material a temperatura inferior a da fase de transição, o mesmo entra na fase martensítica, em que a forma pode ser mudada por deformação mecânica, pois o grupo de átomos, que foram “inclinados” em uma direção

irá acomodar a deformação mecânica em outra direção. A amostra poderá ser revertida à forma inicial (quando estava na fase austenítica) através de aumento de temperatura. A energia térmica adquirida pela forma de aquecimento fornece a energia necessária aos átomos, para regressar em suas posições originais e com isso a amostra volta à forma original, como mostrado na Figura 2 [40].

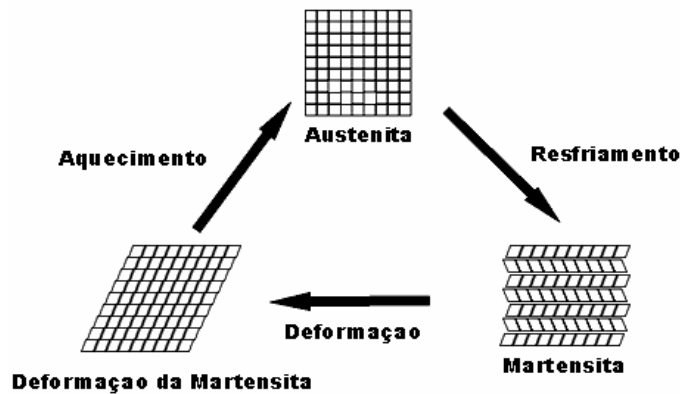


Figura 2: Mecanismos de memória de forma do NiTi [40].

Na Figura 3 [41] o gráfico tensão-deformação da liga NiTi a 10°C pode exemplificar essa propriedade de memória de forma. Nessa temperatura (abaixo de “Mf”) toda a estrutura da liga está na fase martensítica. Ao se aplicar a tensão pode-se notar que o gráfico forma trechos específicos de curvaturas. No trecho (o-a), obtém-se apenas a deformação elástica, onde havendo o descarregamento, a liga volta ao ponto (o). O trecho (a-b) marca o processo de reorientação da martensita maclada para martensita não-maclada. O trecho (b-d) é a resposta elástica à contínua aplicação de carga nesta nova martensita. No ponto C, se o carregamento for removido, a liga terá uma ligeira recuperação, mas continuará com a deformação, aproximadamente, de 5% se mantida a temperatura. A partir do momento em que a temperatura aumentar até “Af”, a liga reverterá à forma caracterizando o seu efeito memória de forma, voltando ao ponto (o). Se a deformação prosseguir, além do ponto (d), a liga sofre movimentação das discordâncias e, conseqüentemente, deformação permanente [41].

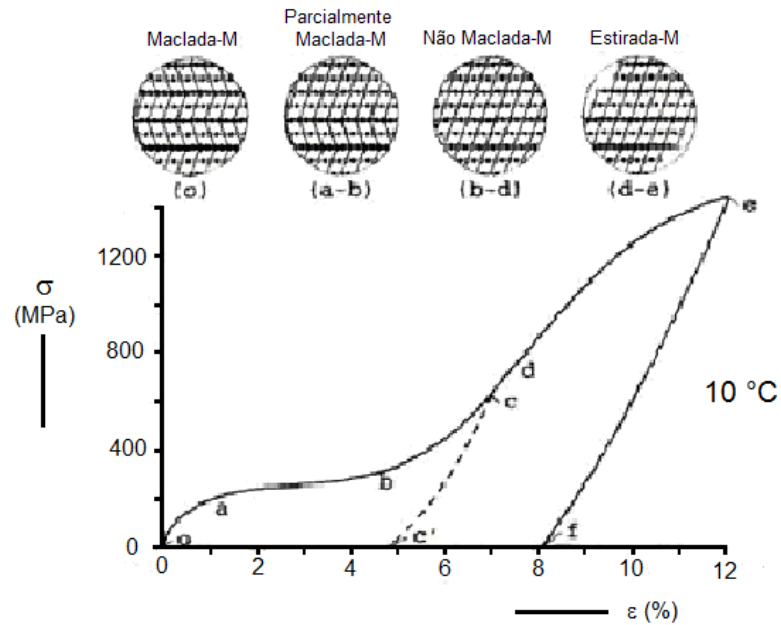


Figura 3: Gráfico tensão-deformação da liga NiTi a 10°C. Associado ao esquema de mudanças micro-estruturais [41].

3.5.2 Superelasticidade

Um material deformado, além de seu ponto de escoamento aparente, recupera totalmente sua forma inicial, quando a carga é retirada. Normalmente observa-se uma grande histerese de tensão-deformação. A superelasticidade acontece na temperatura em que a fase presente seja predominantemente austenítica ($T > A_f$).

A superelasticidade deve seu nome em razão de ligas com memória de forma, sofrem deformação elástica extensa, mais de 20 vezes superior em comparação aos materiais convencionais e sendo total ou parcialmente recuperável. O efeito é baseado na transformação interna da estrutura cristalina austenita, na condição inicial e que necessita de uma força externa ao material, para se transformar em martensita. Após a liberação da força, o material recupera a forma original, sem a necessidade de aquecer o material. A transformação da fase está relacionada ao aparecimento de deformação pseudo-elástica, dando-se a esse efeito o nome de superelasticidade [27].

Ao contrário do efeito memória de forma, a pseudo-elasticidade ocorre sem mudança na temperatura. A carga na LMF é aumentada até a austenita começar a se transformar em martensita e tão logo a carga é decrescida a martensita começa a se transformar em austenita novamente, desde que a temperatura esteja acima de “ A_f ”.

“Md” é a temperatura máxima na qual pode ocorrer martensita induzida por tensão. A superelasticidade ocorre quando $Af < T < Md$ logo, no intervalo entre “Af” e “Md”, conforme [42] a temperatura “Md” é normalmente 25°C a 50°C acima de “Af”.

As ligas NiTi superelásticas são tensionadas, simplesmente, trabalhando a liga. Esses estresses, tensões, podem ser removidos, assim como em outras ligas através de recozimento. A condição de tensão é chamada de martensítica por indução de tensão.

3.5.3 Ferro-Elasticidade

É um comportamento indistinguível da superelasticidade, mas que ocorre em temperatura na qual o material é completamente martensítico ($T < Mf$).

3.5.4 Efeito Memória de Forma de Uma Via (One-Way)

O material que – **aparentemente** – tenha sido deformado plasticamente em determinada temperatura, é capaz de recuperar total ou parcialmente sua forma original, quando aquecido. A palavra “aparentemente” é grifada, para salientar a diferença que existe entre a deformação plástica clássica, conforme definida pela Ciência dos Materiais (deslizamento dos planos cristalinos) e a deformação que tem lugar nas ligas com memória de forma (reorientação das variantes). Os mecanismos internos, nos quais os átomos se arranjam para provocar a deformação visível são diferentes.

Deformações de até 10% podem ser totalmente recuperadas dependendo da composição da liga, tamanho do grão, textura do material, histórico mecânico e térmico, condições nas quais a deformação é aplicada.

O material que tenha recuperado sua forma depois de aquecido, não retornará a sua forma anterior (deformada) quando resfriado, àquela temperatura em que se deu a deformação, característica chamada *one way*, uma via.

3.5.5 Temperatura de Transição nas Ligas Com Memória de Forma

O Dr. F. E. Wang foi um dos primeiros pesquisadores que verificou a existência de duas fases sólidas, conhecidas como austenítica e martensítica, as quais são o rearranjo da posição das partículas dentro da estrutura do cristal sólido. Na temperatura de transição o Nitinol está na fase martensítica. A temperatura de transição varia para diferentes composições e vão de -50°C até 166°C [43]. Na fase martensítica o material pode ser dobrado em diferentes for-

mas e para fixar a forma chamada de forma pai do inglês, “*parent shape*”, o metal é preso na posição deformada em um dispositivo e aquecido em torno de 500°C a 600°C.

3.5.6 As Temperaturas de Transformações de Fases

A primeira preocupação ao se trabalhar com ligas memória de forma é conhecer as temperaturas de transformação (M_s , temperatura de início de transformação martensítica, M_f , temperatura final de transformação martensítica, A_s , temperatura de início de transformação austenítica, A_f , temperatura final de transformação austenítica) e da fase R caso ela ocorra. As propriedades físicas de uma liga NiTi variam de acordo com a quantidade de cada fase presente no material e esta, por sua vez, é função da temperatura da liga. Logo, uma maneira de medir a temperatura em que uma fase dá lugar à outra é medir alguma propriedade física do material diretamente relacionada à quantidade de fase presente ao longo de determinada faixa de temperatura. Existem pelo menos dez propriedades diferentes, que podem ser relacionadas à transformação de fase embora nem todas sejam de fácil medição ou suficientemente precisas para o fim científico [44].

A maneira mais simples de estimar as temperaturas de transformação é, simplesmente, variar a temperatura do corpo enquanto se aplica a ele uma força constante. Quando o alongamento do corpo começa a diminuir é o momento do início da transformação austenítica, é o momento em que o corpo tende a recuperar a forma original anterior a deformação.

Outra maneira bastante utilizada, nos primórdios dos estudos das ligas com memória de forma, é a medida de resistividade elétrica da liga. No entanto, devido à baixa precisão dos resultados e da dificuldade de preparação da amostra, esse ensaio foi substituído por outros, particularmente pelo DSC (*Differential Scanning Calorimeter*). Outras vantagens do DSC sobre o ensaio de resistividade elétrica são os resultados com maior resolução e que permite o cálculo de ΔH (variação de entalpia de formação) da reação. Os dois ensaios não podem ser comparados entre si, pois não fornecem temperaturas de transformação coincidentes [38].

O DSC mede a quantidade de calor emitida ou absorvida durante a mudança de fase, em relação à amostra de comportamento conhecido. A martensita se forma no resfriamento com emissão de calor (reação exotérmica) e isso assinala um pico (ou vale dependendo do sentido convencionado pelo aparelho) na curva de resfriamento. As amostras para esse ensaio são pequenas e sua preparação não exige cuidados especiais, por isso o ensaio de DSC é lar-

gamente utilizado na determinação das temperaturas de transformação de ligas com memória de forma [38].

As temperaturas de transformação das ligas de NiTi estão extremamente ligadas à composição da liga e aos tratamentos térmicos sofridos, durante o processo de fabricação [45].

Qualquer adição de níquel até o limite de 50%, em peso atômico, tem pouco efeito na temperatura de transformação, entretanto, acima desse valor, pequenas adições de níquel podem mudar drasticamente a temperatura de transformação e, por conseguinte, as propriedades mecânicas da liga [44].

3.5.7 Diagrama de Fases do NiTi

Segundo o diagrama de fases (Figura 4), o NiTi sofre a $630^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$, a seguinte decomposição eutetóide: $\text{NiTi} \rightarrow \text{NiTi}_2 + \text{Ni}_3\text{Ti}$. O Metals Handbook, p.2874, alerta que esta reação eutética não é um consenso entre os pesquisadores; de fato, ela é defendida por Lopez e colaboradores [46], mas recusada por Nishida e colaboradores [47].

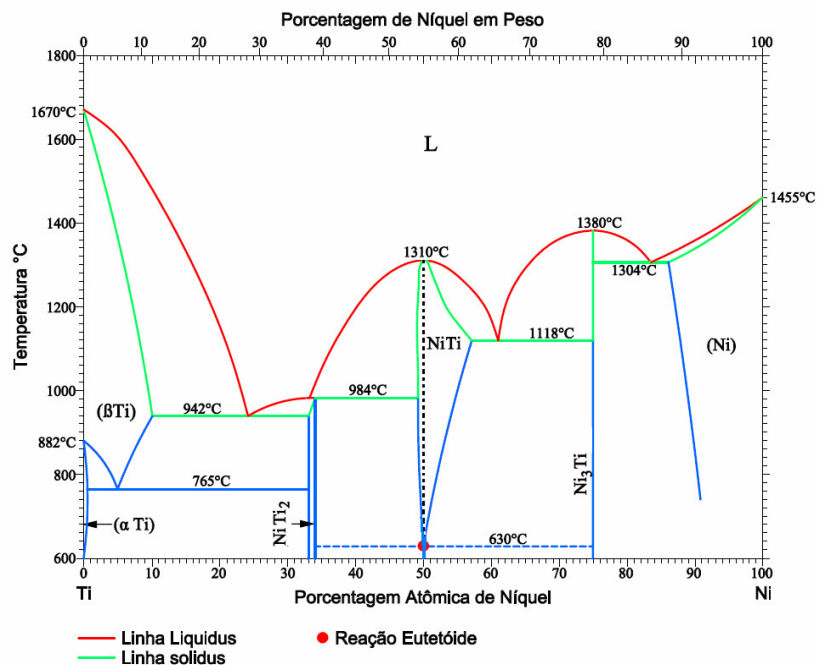


Figura 4: Diagrama de fase binário do NiTi [48].

O diagrama de equilíbrio NiTi permite observar a presença de um domínio de estabilidade na fase austenítica em alta temperatura (acima de 630°C) chamada de fase B2, que se caracteriza para ligas ricas em Ni, em relação à composição equiatômica, por uma variação do limite máximo de solubilidade do Ni com a temperatura. Para as ligas mais ricas em Ti relati-

vamente à composição estequiométrica, a variação de solubilidade com a temperatura é mais reduzida. Essa configuração do domínio de estabilidade da austenita (B2) permite, para uma dada liga, a exploração da possibilidade de variação das temperaturas nos tratamentos de recozimento ou solubilização seguida de precipitação em diferentes temperaturas [49].

3.5.8 Especificação do NiTi

Nitinol é a família de ligas NiTi na qual as temperaturas de transformação são mudadas, mudando-se a relação NiTi. Designam-se as ligas pela “As” (*austenite start*) determinada pela análise térmica após um completo recozimento.

As propriedades do Nitinol são particulares para cada composição exata do metal e modo como foi processado. As propriedades físicas do Nitinol incluem um ponto de fusão em torno de 1240°C a 1310°C e uma densidade em torno de 6,5 g/cm³ [43].

O comportamento elástico e atípico: a maior parte dos materiais metálicos pode ser deformada elasticamente em até 0,2%, já as ligas de NiTi podem ser deformadas em até 8% ou 10% de seu comprimento inicial e retornar, completamente, à sua forma original [50].

Nessas ligas a partir de 2% de deformação elástica, a relação entre tensão e deformação não é mais linear e a força em vez de aumentar à medida que o material se deforma, permanece praticamente constante, num comportamento parecido com borrachas (*rubberlike*) [51].

Conforme a deformação diminui ou aumenta, o material se comporta de maneira diferente, apresentando um desempenho chamado curva de histerese [52].

O implante em Nitinol fará interface com ossos dos arcos costais do arcabouço torácico. Como o objetivo deste trabalho foi desenvolver um grampo para tórax instável, foi importante ter presente alguns conceitos básicos sobre ossos, órteses, trauma torácico e osteossíntese.

3.5.9 Os Ossos no Corpo Humano, Conceituação de Ossos, Órteses, Trauma Torácico, Osteossíntese.

Os ossos fornecem estrutura aos demais tecidos do corpo. Constituem o mais duro de todos os tecidos conjuntivos. Um terço do tecido ósseo é formado por fibras colágenas do tipo I, com pequena quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas, e dois terços são compostos de

sais minerais, primariamente os cristais da hidroxiapatita de cálcio, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, não são exatamente iguais a hidroxiapatita que se encontra nos minerais das rochas. Forma-se osso em reação ao estresse. Embora geneticamente determinado, o tamanho e a forma de um osso são dependentes de fatores ambientais, para sua expressão completa. Essa resposta do osso à sua história de carga tem sido denominada lei de Wolff. Existem dois tipos histológicos principais de osso: cortical e esponjoso. Todos os ossos são cobertos por um tecido altamente vascularizado e innervado, chamado de periósteo, exceto a parte vascularizada dentro de uma cavidade sinovial de uma articulação. Endo-ósteo é a membrana que cobre a linha de superfície interna do osso. O osso cortical é denso, altamente calcificado e construído para resistir a cargas de compressão, pode resistir as vergaduras tenses e cargas torsionais, porém, mais precariamente. Isso é função direta da ultraestrutura do osso cortical, um composto de fibras colágenas flexíveis e de cristais minerais rígidos, que costuma ser encontrado na diáfise de ossos longos e que apresenta uma cavidade central oca, denominada canal medular ou cavidade medular.

Na extremidade dos ossos longos, nos locais de inserção tendinosa e ligamentar, os ossos tendem a se expandir e o osso cortical torna-se uma estrutura mais porosa, denominada osso esponjoso ou trabecular. Os ossos trabeculares ficam na direção das cargas transmitidas e agem como condutos de carga, a partir da superfície articular até o osso cortical diafisário subjacente. A sobrecarga de trabéculas vai, em uma escala microscópica, duplicar a carga de um osso inteiro (por exemplo, fratura). Essa sobrecarga por causa da inervação existente dentro do osso dará origem às dores (desconforto artrítico por sobrecarga mecânica secundária e deformidade articular ou erosão da cartilagem articular). A cicatrização resultante dessas micro-fraturas leva a um depósito aumentado de cálcio formando a esclerose sub-condral, notada em redor das articulações nas imagens radiográficas e a uma hipertrofia nos locais estressados, como a parte média da diáfise da tíbia, secundariamente há fraturas de estresse, ocorrendo pela sobrecarga, em corredores [53].

Osteointegração segundo Branemark é a ligação direta, estrutural e funcional entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeita as cargas funcionais [54]. Osteocondução é a habilidade de gerar a formação de osso na superfície do material no meio ósseo. E osteoindução é a habilidade de induzir a formação de osso em tecidos não-ósseos.

Implante: é um dispositivo médico feito de um ou mais biomateriais, que é intencionalmente incluído dentro do corpo, total ou parcialmente abaixo da superfície epitelial.

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), materiais e artigos implantáveis são os materiais e artigos de uso médico ou odontológico, destinados a serem introduzidos total ou parcialmente no organismo humano ou em orifício do corpo ou destinados a substituir uma superfície epitelial ou superfície do olho, através de intervenção médica, permanecendo no corpo após o procedimento por longo prazo e podendo ser removido unicamente por intervenção cirúrgica [4].

Quando aplicado em implantes as ligas NiTi proporcionam novas capacidades funcionais, melhorando o desempenho e a possibilidade de novas técnicas minimamente invasivas. Proporcionam, ainda, a possibilidade de auto-fechamento, auto-expansão e auto-compressão em implantes ativados pela temperatura do corpo [55].

Órtese é um dispositivo médico adicionado ao corpo de uma pessoa para sustentação, alinhamento, posicionamento, imobilização, impedimento ou correção de uma deformidade, ajudando músculos fracos ou melhorando suas funções [56].

As órteses podem cumprir as seguintes funções básicas: ser utilizadas para sustentar, imobilizar ou restringir uma ou mais partes do corpo e prevenir uma deformidade, auxiliar num movimento, que se encontra inapropriado pela debilidade muscular, além de servir como base na fixação de dispositivos de auto-ajuda (adaptações).

As órteses podem ser classificadas como estáticas e dinâmicas. As estáticas são caracterizadas por estabilizarem um segmento, deixando-o em repouso e em posição anatômica e funcional, podendo, ainda, ser divididas em funcionais, quando permitem a manipulação de objetos e de repouso quando imobilizam o segmento não permitindo a funcionalidade.

As órteses dinâmicas proporcionam, através de “elásticos” ou outros materiais alguma mobilidade, tração e função ao segmento.

3.6 Trauma Torácico

Chama-se trauma torácico, lesão caracterizada por alteração estrutural ou desequilíbrio fisiológico, decorrente de exposição aguda a várias formas de energia, tal como a energia mecânica [57]. A Figura 5 mostra a fisiologia do tórax paradoxal.

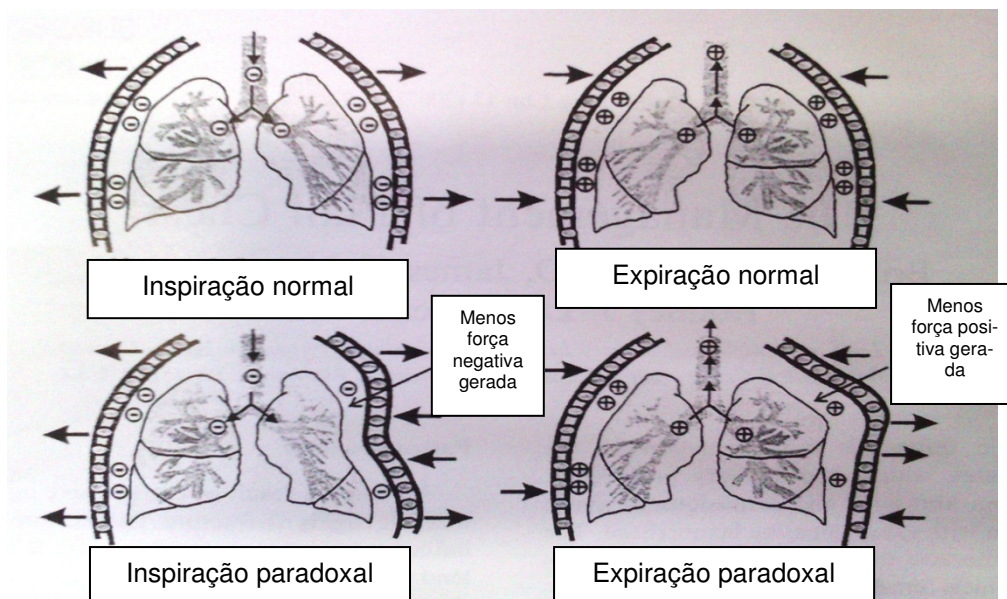


Figura 5: Fisiologia do tórax paradoxal [58].

Dentre as formas possíveis [Figura 6] de fratura do tórax, as principais são:

- Os traumas anteriores, potencialmente instáveis, associam duas fileiras de fraturas em nível dos arcos costais anteriores direito e esquerdo. Distinguem-se as fraturas em estreitas e largas. Um dos traços da fratura pode se localizar no esterno com trajeto oblíquo-vertical.
- Os traumas antero laterais são delimitados por uma linha de fratura anterior e uma linha lateral. Distinguem-se as fraturas em estreitas, pelas duas fileiras de fraturas sobre o mesmo hemitórax e as fraturas largas, pelas duas fileiras situadas em uma parte e outra do esterno.

Os traumas posteriores ou posterolaterais são caracterizados por uma linha de fraturas laterais e uma linha de fraturas posteriores. São geralmente estáveis, por estarem recobertas pela massa de músculos dorsais. Podem se tornar instáveis se o traço da fratura lateral está situado à frente do arco costal superior [59].

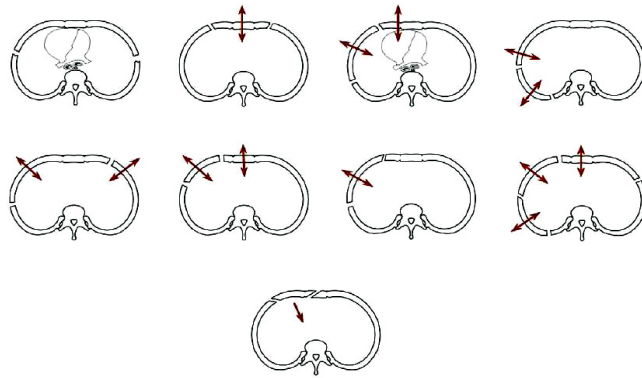


Figura 6: Tipos de fraturas [59].

A Figura 7 mostra o conjunto do arcabouço torácico mostrando a disposição dos arcos costais (costelas) e as vértebras.

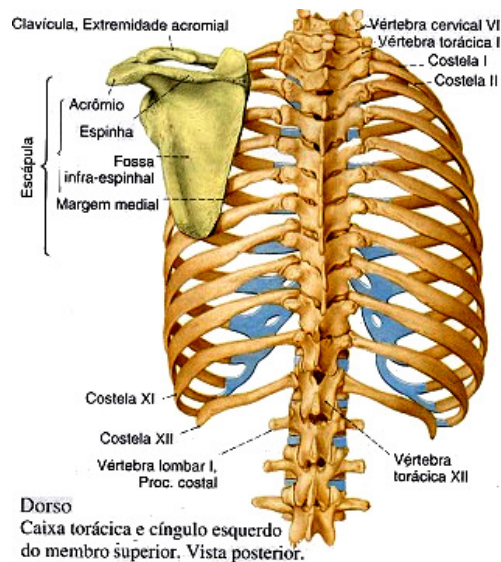


Figura 7: Arcabouço torácico mostrando as costelas e as vértebras [60].

3.7 Grampos de Judet

A Figura 8 mostra o arcabouço torácico com diversas osteossínteses costais. Osteossíntese define-se como a utilização de implantes para unir osso fraturado na posição requerida de forma a promover a sua consolidação de forma satisfatória, que é denominada fixação rígida.

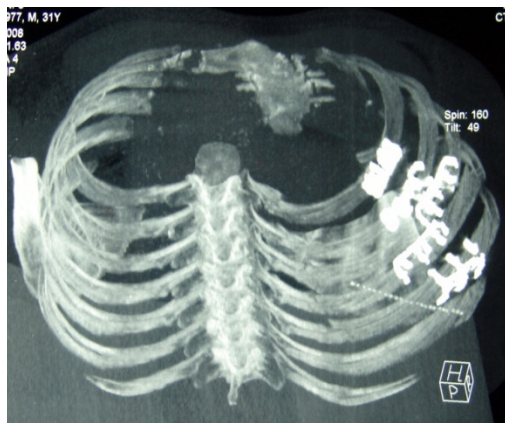


Figura 8: Trauma Torácico. Caso clínico: reconstrução de tomografia computadorizada com ênfase no arcabouço ósseo torácico demonstrando múltiplas osteossínteses costais, fixadas por grampos de Judet [61].

Judet descreveu, em 1972, um sistema de osteossíntese costal por grampo. Cada grampo imobiliza uma parte da fratura.

Situações e indicações para inclusão dos grampos de Judet:

- a) Paciente piora ao “desmamar” da ventilação mecânica.
- b) Paciente com três ou mais costelas fraturadas consecutivas e cada costela com no mínimo dois pontos de fratura.
- c) Importante perda respiratória devido às fraturas.

3.8 Grampos de Sanchez-Lloret

Os grampos de Judet são ideais para fraturas simples nas quais os dois segmentos da costela são conservados e podem ser adequadamente reduzidos. No caso de costelas trituradas com perda de integridade da parede costal prefere-se o grampo de Sanchez-Lloret (Figura 9). Grampos ideais para reconstruir a parede costal.



Figura 9: Grampo de Sanchez-Lloret [62].

3.9 Aplicação Médica – Fratura Costal e o Parênquima Pulmonar

3.9.1 Tórax Instável

O tórax instável (tórax paradoxal) é diagnosticado, quando na inspiração, o local da fratura se deprime e no momento da expiração há expansão [63]. O afundamento torácico (*flail chest*) ocorre em casos de danos graves da parede torácica, com fratura de três ou mais costelas consecutivas e, no mínimo, de dois pontos de instabilidade em cada costela [64]. A reconstrução da parede torácica deverá ser rígida, para que não ocorra movimento paradoxal durante a respiração [65]. E deve ficar hermeticamente fechada, para evitar o pneumotórax [66], que pode pressionar o pulmão causando falta de ar e até deslocamento do coração com alteração de seus batimentos, causando a morte do paciente. O principal objetivo da estabilidade do tórax é permitir a adequada ventilação pulmonar, o mais rapidamente possível, no pós-operatório [63].

Os grampos de Judet têm sido usados para estabilização de costelas fraturadas, que nesse caso clínico é chamado tórax instável. O tórax instável traz complicações a 10 e 20% dos pacientes com trauma torácico e a mortalidade associada é de uma relação de 10 a 35% desses pacientes. O tratamento de tórax instável tem mudado a cada ano, com a consequente melhoria das técnicas ventilatórias e o melhor entendimento da pato-fisiologia do complexo da síndrome do trauma e falha respiratória aguda. Até o presente momento é largamente aceito, que o dano respiratório no tórax instável dos pacientes, é unicamente devido à ineficiente ventilação, relacionado ao movimento paradoxal da parede do tórax, que é significativamente relacionado por outros danos torácicos associados, em particular, contusão pulmonar e atelectasias, quando causada por fratura costal, chama-se atelectasia restritiva. Na última década, o pilar do tratamento para tórax instável tomou novos rumos, do tratamento da instabilidade para o tratamento dos danos associados, com particular atenção à contusão pulmonar. Estabilização pneumática interna, com ventilação mecânica, é o tratamento padrão para pacientes com tórax instável e insuficiência respiratória ou quando associado a problemas da cabeça e/ou abdômen, que requerem ventilação mecânica. Mesmo que a ventilação a volume tenha reduzido a mortalidade dos pacientes, com severa instabilidade de tórax, a associação da pneumonia com a ventilação mecânica é frequentemente associada. Entretanto o tratamento cirúrgico de pacientes com severa instabilidade de tórax é, ainda, controverso e acreditam esses autores que a estabilização cirúrgica é fortemente indicada em situações cirúrgicas específicas. A efetividade e o tempo ideal de estabilização da parede torácica em pacientes sob ven-

tilação mecânica estão relacionados ao grau de danos no parênquima pulmonar. A presença de extensiva contusão pulmonar é relativa contra-indicação à estabilização cirúrgica. Esses pacientes requerem prolongada ventilação e a estabilização cirúrgica precoce não traria benefícios. Entretanto o procedimento cirúrgico pode ser proposto, se o paciente piorar ao “desmar” do ventilador, uma vez que a solução parcial da contusão pulmonar é alcançada [62].

A osteossíntese é indicada quando o paciente pode ajudar ativamente na reabilitação e contra-indicada para pacientes obesos, idosos, com insuficiência respiratória importante ou lesão associada, tais como traumatismo craniano, lesão medular e outras [59].

Diferentes modelos de grampos estão disponíveis, de várias larguras e comprimentos com dois ou três pares de garras em cada extremidade. As garras são assimétricas, formando de um lado um ângulo agudo destinado à borda inferior da costela e, a outra, em ângulo aberto (superior) perfeitamente adaptada à morfologia costal lateral; com efeito, atrás a secção costal é redonda, o que não permite ajuste dos grampos de Judet [59].

Nas cirurgias de tórax instável, utiliza-se o aço inoxidável 316 L, na aplicação em forma de grampos (grampos de Judet) para reabilitação e restabelecimento das funções pulmonares, nesses grampos em aço inoxidável há o inconveniente de exigir grande esforço e habilidade do cirurgião torácico durante o procedimento cirúrgico.

A Figura 10 mostra o grampo de Judet em aço inoxidável, implantado, em detalhe a pinça segurando o osso, seção transversal.

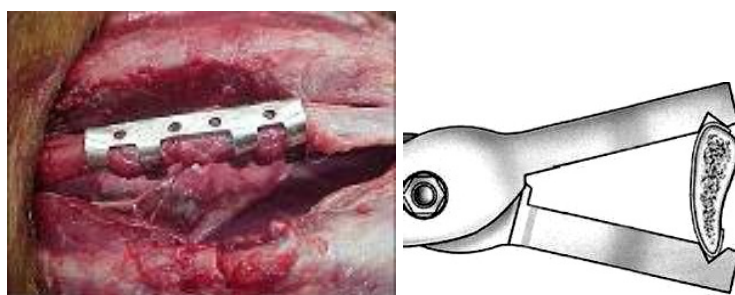


Figura 10: Aplicação do grampo de Judet em aço inoxidável e instrumento segurando o grampo e a costela [59].

3.10 Acessórios Para Inclusão de Grampos em Aço Inoxidável

Três pinças, conforme Figura 11, permitem incluir os grampos nas costelas: uma pinça reta e duas pinças na forma de cotovelo, uma sobre o plano e outra sobre o plano de corte.



Figura 11: Modelos de pinças [59].

A Inserção de grampos na reabilitação de ossos em Nitinol varia de acordo com o tipo de Nitinol utilizado.

3.11 Inserção de Grampos em NiTi para Estabilização de Ossos no Corpo Humano

Do ponto de vista de aplicações práticas o NiTi pode ter três diferentes formas: NiTi martensítico, muito mole. NiTi superelástico (martensita induzida por tensão), que é altamente elástico, e NiTi austenítico, que é duro [67].

O Nitinol utilizado como grampo para reabilitação de ossos recai em três categorias: SE, BT, HA.

Aqueles que são superelásticos em temperatura ambiente (SE), aqueles que recuperam sua forma com a temperatura do corpo (BT) e, aqueles, que recuperam sua forma com fonte externa de calor (HA).

3.11.1 Superelástico (SE)

Nessa forma de Nitinol para grampo a “Af” está próxima ou menor, que a temperatura ambiente e o grampo deve ser seguro, aberto através de algum dispositivo, antes de se desdobrar. Esse tipo de grampo tentará se soltar tal qual efeito mola em qualquer temperatura próxima ou acima da temperatura ambiente, tão logo a restrição seja removida.

3.11.2 Temperatura corporal (BT)

Este tipo de grampo em Nitinol, utilizado para grampos tem temperatura “Af” abaixo da temperatura corporal, mas acima da temperatura ambiente. A recuperação de forma é acionada pelo efeito memória de forma, quando o grampo atinge a temperatura do corpo. É importante manter a temperatura do grampo suficientemente abaixo da temperatura do corpo duran-

te a inclusão, para prevenir o desdobraimento prematuro. Isso pode ser realizado através da combinação de resfriamento externo e rapidez de inclusão.

3.11.3 Termo Ativado (HA)

Esta categoria de grampo de Nitinol tem “As” próxima ou levemente acima da temperatura do corpo, mas com “Af” baixa o bastante para permitir o desdobraimento, sem a aplicação de excessivo calor. A temperatura de 60°C é reconhecida como a temperatura aproximada, na qual pode acarretar danos ao tecido, logo a temperatura de ativação deve ser mantida abaixo dessa temperatura. Esse tipo de grampo pode ser ativado em um dos dois casos: pelo simples elemento de calor, tal qual um eletrobisturí ou usando uma fonte de calor externo especial que possa ser, precisamente, controlada, dependendo da recuperação de forma desejada. Esse último tipo de grampo é subconjunto do tipo “HA”, que terá subseqüentes discussões como tipo “termo ativado e controlado” [68].

Basicamente existem dois modos, para se trabalhar com ligas memória de forma para estabilização de ossos.

De acordo com o primeiro modo, os elementos estão completamente martensíticos na temperatura ambiente e são deformados e incluídos em temperatura ambiente. Depois da inclusão, os elementos são localmente aquecidos entre 42 e 45°C, com temperatura acima de “Af” e, transformam-se em forma austenítica, retomando sua forma memorizada austenítica.

Os grampos, então, resfriam-se para voltar à temperatura corporal, que é geralmente abaixo de “Af”, entretanto ainda acima de “Ms”. Então, no corpo, a liga memória de forma permanece austenítica, retendo seu formato austenítico. A vantagem desse modo, é que os elementos de memória de forma não precisam ser resfriados, a fim de permanecer na fase martensítica antes da inclusão. As desvantagens são as seguintes: as propriedades mecânicas atípicas da liga, não são definidas na temperatura do corpo e os elementos não são superelásticos no corpo.

De acordo com o segundo modo, “Af” é projetada abaixo da temperatura do corpo, os elementos de memória de forma são resfriados entre zero e -5°C ou menos para uma temperatura abaixo de “Mf”, para deformação e inclusão no osso. Após inclusão os elementos são naturalmente aquecidos com a temperatura corporal, pelo contato do corpo. Desde que a temperatura do corpo seja acima de “Af” da liga, os elementos passam para a fase austenítica e retomam sua forma austenítica memorizada.

As vantagens desse modo são que no corpo os elementos de memória de forma estão completamente austeníticos, suas propriedades mecânicas são definidas e se propriamente termo-tratadas tornam-se superelásticas. A desvantagem, entretanto, é que a deformação plástica, na fase martensítica deve ser feita depois de os elementos serem resfriados e os elementos deformados devem permanecer resfriados, durante o procedimento de manipulação e de inclusão.

Os grampos para estabilização de fraturas fabricados com LMF são bem conhecidos, eles são facilmente incluídos na fase martensítica, quando deformados, abertos, retos e após retomam sua forma fechada e firme no tecido ósseo, formando um fechamento na fratura.

3.12 Inclusão do Grampo de Judet

A inclusão vista na Figura 12, foi feita com grampo de Judet, fabricado em aço Inoxidável 316 L, pelo seu maior módulo de elasticidade, conseqüentemente, de maior rigidez, o cirurgião precisa dobrar cada ponta do grampo sobre o osso, sendo diferentes os dobramentos de cada ponta. Com a aplicabilidade em aço inoxidável, as características da superfície podem comprometer a biocompatibilidade do material, pois o cirurgião ao fazer força pode provocar arranhões na superfície do grampo.

A Figura 12 mostra a inclusão de um grampo de Judet em osteossíntese costal de animal.

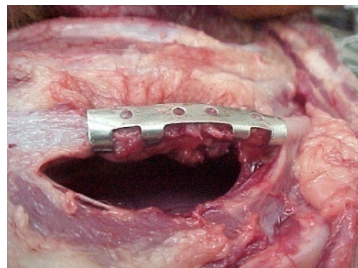


Figura 12: Estabilização de tórax através da inclusão dos grampos de Judet em animal [69].

O entendimento da classificação dos biomateriais tem importância na escolha das células que serão utilizadas nos testes de citotoxicidade, ou seja, aquelas células que vão encapsular o implante.

3.13 Biomateriais, Biocompatibilidade do NiTi

3.13.1 Biomateriais

Biomateriais são materiais usados para substituir ou reparar tecidos vivos danificados. Os materiais usados em contato com o sangue ou outros tecidos, devem ser criteriosamente escolhidos e testados. Devem ser suficientemente, resistentes aos impactos, para evitar rupturas ou fraturas durante o uso, não devem reagir quimicamente com os componentes do sangue, nem liberar resíduos químicos na corrente sanguínea; não devem apresentar variações importantes de resistência ou de consistência quando expostos ao calor ou frio. Devem ter coeficiente de absorção de água muito baixo ou nulo e deve ser impermeável a água, aos gases, exceto em alguns casos. A superfície dos materiais com os quais o sangue entra em contato deve apresentar potencial de cargas elétricas negativas, para diminuir a formação de grumos celulares. Diz-se que o material é biocompatível, quando não causa influências negativas num ambiente biológico [70].

Segundo autores [71], alguns pré-requisitos são desejáveis para que um biomaterial seja aplicado nos tecidos duros e moles tais como a biocompatibilidade que significa uma menor toxicidade intrínseca do material, baixa da reatividade com macromoléculas, da indução de resposta inflamatória ao longo do tempo e da imunogenicidade; biofuncionalidade que é diferente para osso, tecidos moles ou próteses vasculares quanto à mecânica; textura de superfície compatível com a adesão celular; resistência à corrosão para impedir a degradação do material frente aos fluídos corporais; bioadesividade química, eletrostática e mecânica com o intuito de promover uma ligação entre a prótese e o tecido adjacente combinando um período de cicatrização, evitando encapsulamento fibroso excessivo do implante; prevenir adesão bacteriana e ou facilitar sua morte.

3.14 Classificação dos Biomateriais

Os biomateriais são classificados em: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioabsorvíveis.

Biotoleráveis: são os materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Quanto maior a espessura da camada do tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos, assim como a grande maioria dos metais.

Bioinertes: são materiais também tolerados pelo organismo, mas em que a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. Em alguns casos essa camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são: alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono.

Bioativos: são os materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração). Os materiais mais comuns são a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

Bioabsorvíveis: são os materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Como exemplos têm-se o fosfato tricálcico (TCP) e o ácido polilático [72].

Biomateriais, segundo sua origem, são mostrados na Figura 13.

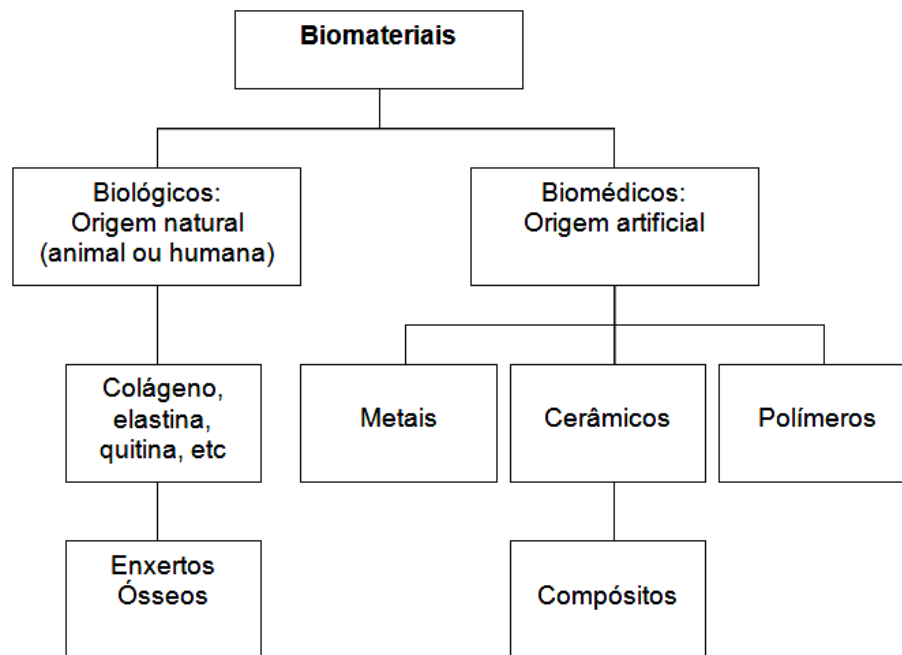


Figura 13: Fluxograma dos Biomateriais [73].

3.15 Biomateriais Segundo Resposta dos Tecidos

A Tabela 1 mostra a resposta dos tecidos na classificação dos biomateriais.

Tabela 1: Biomateriais segundo resposta dos tecidos [72].

Tipo de material	Toxidade	Bioatividade	Resposta do tecido
Biotolerável	Não Tóxico	Nula	Tecido Fibroso
Bioinerte	Não Tóxico	Nula	Tecido Fibroso
Bioativo	Não Tóxico	Bioativo	Ligação Interfacial
Bioabsorvível	Não Tóxico	Dissolve	Recuperação do Tecido

3.16 Materiais Metálicos Utilizados em Implantes Segundo ASTM/NBR ISO

Normas regulamentadoras ASTM/NBR ISO.

“Nenhum material para implante cirúrgico mostra ser completamente livre de reações adversas no corpo humano. Entretanto, experiências clínicas prolongadas do emprego do material referenciado nestas normas mostram que o risco de reação é pequeno e as vantagens de seu emprego são mais relevantes que qualquer risco. Conseqüentemente, a possibilidade de tais riscos deve ser considerada aceitável”.

A Tabela 2 mostra as propriedades mecânicas do Nitinol utilizados nas órteses e próteses ortopédicas.

Tabela 2: Propriedades mecânicas do Nitinol [35].

Material	Biocompatibilidade	σ_e (MPa)	σ_t (MPa)	E(GPa)
NiTi Mart.	Biotolerável	50-300	103-1100	21-69
NiTi Aust.	Biotolerável	100-800	800-1500	70 -110

A Tabela 3 mostra as propriedades mecânicas do osso cortical e trabecular. Essas propriedades auxiliam, diretamente, na escolha das próteses ou órteses de acordo com as solicitações biomecânicas.

Tabela 3: Propriedades mecânicas do osso cortical e trabecular [35].

Osso	σ_t (MPa)	E (GPa)
Osso Cortical Longitudinal	133,0	17,7
Osso Cortical Transversal	52,0	12,8
Osso trabecular	7,4	0,4

3.17 Biocompatibilidade

Biocompatibilidade é, basicamente, a capacidade dos materiais em não se decompor sob condições ambientais próprias do corpo humano, assegurando suas propriedades mecânicas, por longos períodos de tempo após a fabricação. Significa que os materiais não liberam íons ou que o fazem dentro dos limites aceitáveis pelo corpo e que geram respostas alérgicas (inflamatórias) mínimas pelo paciente [74].

O estudo da liga memória de forma de NiTi tem sido largamente estudada na China desde 1978. Numa série de testes de corrosão, observações histológicas teste de toxidez, testes carcinogênicos, análises de traços de níquel e experimento clínico têm sido conduzidos desde então. Os resultados mostraram, que a liga NiTi é material biocompatível e nenhuma reação local de tecido, carcinogênese ou erosão de implantes foram encontrados experimentalmente e clinicamente [74]. Em 1981, com base nesses estudos, o grampo de memória de forma foi usado pela primeira vez dentro do ser humano. Subseqüentemente vários outros dispositivos de memória de forma foram projetados e aplicados clinicamente para fixação interna de fraturas, cirurgias de coluna, endopróteses, cirurgia ginecológica e craniofacial. Desde 1990, uma série de “Stents” internos foram desenvolvidos para a aplicação biliar, traqueal, estrutura esofágica e uretroestenoses, bem como o obturador vascular para controle de metástases tumorais. Milhares de casos foram tratados tendo um acompanhamento de 1 a 10 anos com bons resultados clínicos e baixo número de complicações.

O sucesso de um implante metálico no corpo humano deve-se à resposta clínica pretendida que dependerá em primeiro lugar da biocompatibilidade do componente e como consequência, de uma discreta resposta inflamatória do receptor.

Conforme autores [75] há dois principais fatores que determinam a biocompatibilidade de um material: a rejeição induzida pelo material e a degradação do material no ambiente do corpo.

Segundo autores [76], há quatro tipos de defeitos sistêmicos causados pela introdução de um material estranho no corpo humano. Os defeitos: carcinogênico, metabólico, imunológico, bacteriológico. No momento do implante o organismo humano reage ao material implantado.

3.18 Resposta do Organismo Humano aos Biomateriais Metálicos

A resposta do corpo para implantes varia largamente de acordo com o local de acolhimento, as espécies de implantes, o grau de trauma imposto durante a implantação e todas as variáveis associadas com o normal processo de cicatrização [35].

O implante de um biomaterial metálico acarreta, obrigatoriamente, na lesão do tecido ósseo. Como consequência será ativada uma resposta inflamatória inata que tem por finalidade remover os resquícios de células necróticas e de matriz extracelular alterada. Esta tarefa é realizada inicialmente por neutrófilos que logo são substituídos pelos macrófagos e por uma de suas sub-populações especializadas, os osteoclastos. Uma vez complementada esta ação de limpeza, existem duas possibilidades. A primeira, que ocorre na maioria das vezes, forma um tecido de granulação composto por vasos neoformados que dão apoio à proliferação dos fibroblastos, com produção de colágeno. Esta reação, conhecida como reparação, leva à formação de uma cicatriz fibrosa que circunda a prótese. A segunda, que seria a resposta ideal, corresponde ao processo conhecido como regeneração. Nesse processo, ocorre proliferação dos osteoblastos com formação de novo tecido ósseo que, além de circundar, se integra à prótese. Um material bioativo estimularia a segunda resposta [77]. O trabalho dos macrófagos é a fagocitose.

Fagocitose: alguns tipos celulares como os macrófagos e os neutrófilos são especializados para englobar e eliminar bactérias, fungos, protozoários, células danificadas e moléculas do meio extracelular que se tornaram desnecessária [78].

Na fagocitose há o reconhecimento, adesão, engolfamento, morte, degradação [77].

Existe uma variedade de requisitos a serem obedecidos, para que um material possa ser considerado implantável, a biocompatibilidade é um deles. A propriedade física do material para ser implantado não é o único quesito a ser observado, pois somente isso não garante a possibilidade de implante, mas com certeza é o que possibilita a próxima fase de aprovação, que é a biocompatibilidade, aceitação do material dentro de um meio biológico, onde sua capacidade de funcionamento não gera distúrbios imunológicos ao hospedeiro e, também, que o hospedeiro não atue negativamente sobre o dispositivo de modo que este venha a perder sua função [79]. Quando se avalia biocompatibilidade, observa-se, citotoxicidade, sensibilização, toxicidade sistêmica, hemocompatibilidade, entre outros. Essas análises são imprescindíveis para avaliar como o organismo se comporta em relação ao material de implante.

As ligas metálicas têm sido usadas com sucesso como biomateriais que de um modo básico, são materiais capazes de reconstituir ou substituir tecidos e funções corpóreas sem que reajam negativamente ao hospedeiro [80]. Para verificar a interação material *versus* meio biológico, testes *in-vitro* e *in vivo* são realizados. Nesse trabalho foram feitos testes, cultura de células e de citotoxicidade *in vitro* para avaliação das superfícies produzidas.

A modificação produzida na superfície será determinante para o crescimento celular daí a importância de se produzir tipo específico de superfície para cada tipo de célula.

3.19 Acabamento Superficial

Aspectos superficiais dos implantes fabricados em NiTi são fundamentais na determinação do seu desempenho. O Ni é considerado tóxico, sua liberação dentro do corpo humano deve ser evitada. Segundo autores [13], o filme superficial de óxido formado nos tratamentos podem impedir a difusão de Ni dentro do organismo, dependendo de sua estrutura, estabilidade, composição e espessura. Quando um componente metálico de NiTi é exposto a altas temperaturas, a faixa de exposição determina o tipo de óxido formado em sua superfície, o tempo de exposição determina a espessura da camada formada e a espessura da camada determina a coloração do mesmo [56].

3.20 A Superfície do NiTi

A superfície do NiTi consiste, principalmente, de óxido de titânio (TiO₂) e pequenas quantidades de óxido de níquel (NiO e Ni₂O₃) e níquel metálico, enquanto o níquel-titânio constitui-se da camada inte

ma [81, 82, 83, 84].

A superfície do NiTi não-tratado é composta principalmente de oxigênio, carbono e óxido de titânio e traços de níquel. O níquel pode dissolver mais facilmente que o titânio, porque seu óxido não é estável. Nas camadas da superfície de níquel-titânio, em arcos ortodônticos, foram encontrados aspectos irregulares, caracterizados por estruturas “*island-like*”, tipo ilhas onde a dissolução seletiva de níquel pode ocorrer [82].

A boa compatibilidade do NiTi e outras ligas de titânio, pode ser obtida pelo filme de fosfato de cálcio, enquanto que a resistência à corrosão é promovida pelo filme passivo de óxido [81]. Em estudos tem se evidenciado que, componentes metálicos das ligas usadas na ortopedia, podem ser tóxicas e dissolver no corpo, devido à corrosão [85]. Todo o metal tem sua

própria e intrínseca toxicidade com as células, porém a corrosão, na maioria das vezes, pode potencializar essa ação nociva.

Portanto, a resistência à corrosão da liga NiTi e a toxidez de metais individuais, que compõem a liga, são os principais fatores determinantes de biocompatibilidade [85].

A corrosão de metais em solução aquosa acontece via mecanismo eletroquímico. Diferentes materiais têm diferentes tendências para corroer, dos mais nobres aos menos nobres. As reações acontecem na superfície dos metais e em específicos meios, que podem causar mudanças de seu comportamento. Depois do implante, o material é circundado por íons de soro, proteínas e células, que podem ser alterados pelas reações de corrosão. O comportamento da corrosão pode variar em ensaios “*in vitro*”, “*in vivo*” e em ambiente fisiológico e não fisiológico. A corrosão é muito estudada, pois todo o implante metálico corrói dentro do corpo humano [75]. O corpo humano é um meio agressivo por conter elevada concentração de íons sódio e cloro.

Após implantação, costuma-se medir concentrações metálicas em distantes órgãos do implante. Isto ocorre não só devido à ionização, mas pela fagocitose celular, que é a absorção e expulsão de elementos nocivos do organismo. Algumas formas de corrosão são típicas de implantes, as corrosões em pontos centralizados chamados de “*pittings*” também a corrosão galvânica ocorre, quando se usa materiais diferentes. O “*fretting corrosion*” ocorre quando há micro-movimentos entre dois metais e são quebradas suas camadas de passivação [86].

Há inúmeros fatores, que afetam a corrosão metálica. A porosidade e a rugosidade aumentam a reatividade da superfície, contribuindo com a quantidade de corrosão. A área sujeita a mais cargas, tem mais corrosão do que a área sujeita a menos cargas e onde são incluídos os implantes [87].

A estrutura, a composição e a espessura da camada passiva são altamente dependentes do metal e o meio do implante. Os metais têm defeitos, impurezas, contaminantes, que afetam a reação de corrosão. Diferentes tratamentos térmicos e trabalhos a frio podem modificar o tamanho de grão, estado de energia do metal e causar heterogeneidade de superfície [85] e todos esses fatores podem afetar a passividade de camada.

Outros autores [14] relataram estudos em uma liga NiTi, com Ni 55,8%, sendo % em peso. As superfícies das amostras tratadas termicamente foram modificadas por polimento mecânico e eletropolimento seguido de passivação. As superfícies tratadas termicamente a-

presentaram oxidação cor dourada e oxidação cor azul. Eles mostraram conforme Tabela 6 que a rugosidade superficial obedece a seguinte ordem: eletropolido e passivado < eletropolido < oxidação dourada < oxidação azul < polido mecanicamente, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Média de rugosidade (Ra). Resultado de testes em diferentes amostras [14].

Nome da amostra	Rugosidade Média: Ra (nm)
Eletropolida e passivada	0,86
Eletropolida	1,74
Oxidação dourada	5,06
Oxidação azul	7,90
Polida mecanicamente	9,15

Eles relataram ainda sobre a liberação de níquel nos cinco grupos de amostras, conforme determinado por espectroscopia de absorção atômica no reduzido tempo medido. O nível de íons níquel lançado ao longo de um período de imersão de 25 dias foi maior na amostra amarela de 2 µg por dia. Este nível de níquel é insignificante em comparação com a ingestão diária de níquel em uma dieta normal. Conforme [6], o níquel é elemento essencial no corpo humano, entretanto quando o limite diário de digestão de 200-300 µg é excedido, isto causa severos problemas imunológicos. Antes de colocarem as amostras em solução de Hanks eles mediram as camadas de óxidos das superfícies em AES (*Auger Electron Spectroscopy*) e todas apresentaram níquel e titânio e pequena quantidade de oxigênio, carbono e enxofre como contaminantes. As espessuras de óxido nas superfícies ficaram na seguinte ordem conforme mostrado na Tabela 5: Eletropolido e passivada<eletropolido<polido mecanicamente< oxidação azul < oxidação dourada.

Tabela 5: Espessura de óxidos nas superfícies das amostras (1 Å = 0,1 nm) [14].

Nome da amostra	Espessura de Óxido na Superfície (Å)
Eletropolida e passivada	65
Eletropolida	130
Polida mecanicamente	200
Oxidação azul	730
Oxidação dourada	1060

3.20.1 Passivação do NiTi

A resistência à corrosão de metais e ligas metálicas está, principalmente, baseada no fenômeno de passivação [87]. A passivação de um metal ocorre devido à presença de uma compacta cobertura, chamada camada passivada, que contém metal original, que forma uma camada de óxido, uma “pele” sobre o metal. Essa camada de óxido pode ser amorfa ou cristalina. A composição da camada de óxido muda de sua superfície externa em sentido ao metal. Contaminantes de P e Ca são, geralmente, encontradas.

Quando os íons metálicos são dissolvidos, de pontos onde a camada de óxido não está completamente desenvolvida, eles formam hidróxido metálico. Então eles ficam imediatamente rodeados de moléculas de água, que se unem a camada passivada. Quando há íons cloreto presentes como no plasma humano, há substituição das moléculas de água, da camada passiva. Se a camada passiva não está completamente desenvolvida, os íons metálicos dissolvidos formam o complexo metal-cloro, que dissolve fluído dentro do corpo. Isso prejudica a passividade no local e pode levar ao (*pitting corrosion*) corrosão por cratera [75].

Quando a camada passiva é quebrada localmente esta área anódica é pequena e a área catódica em volta grande. Isso leva a uma rápida corrosão local inesperada e rápida destruição do material [87].

A corrosão in vivo, constitui-se em um dos testes finais e fundamentais para a aprovação de um implante. Muitos pesquisadores tem se preocupado com a possibilidade de haver corrosão devido à degradação do material por ação dos líquidos do corpo.

3.20.2 Corrosão in Vivo

Alguns autores [22] relataram não ter encontrado nenhuma corrosão generalizada ou localizada em chapas de NiTi sob exame microscópio com acompanhamento de até dezessete meses depois de um implante em cachorros e as análises em órgãos distantes não mostraram qualquer acumulação de traços metálicos de NiTi.

Outros autores [88] implantaram quarenta e quatro “Stents” de NiTi intraluminal em artérias ilíacas de vinte e duas ovelhas e foi observada corrosão mínima em seis semanas. “Pittings” foi o predominante tipo de corrosão encontrado, eles estimaram que a taxa de “pit” de penetração no meio, deva ser de aproximadamente 0,0046 cm por ano. A análise do produ-

to da corrosão indicou ser o principal produto em volta do “*pitting*”, que foi de esfera de titânio composto, provavelmente, de óxido.

3.21 Tratamentos de Superfície em Biomateriais

Os tratamentos de superfície têm como objetivo o estabelecimento de uma ligação química e mecânica do osso com a superfície do implante. As propriedades de superfície devem incluir tanto aspectos estruturais quanto químicos, desde a escala macroscópica até o nível atômico e são fatores essenciais na formação da base da resposta biológica aos biomateriais [19, 71, 89, 90].

A fim de melhorar a resposta osteológica dos implantes é desejável aumentar a bioatividade da superfície da liga NiTi [6].

Resultados positivos para a bioativação do NiTi foram alcançados por tratamentos térmicos [7] e oxidação da superfície por método químico [8].

Diversos tratamentos de superfícies foram estudados com a finalidade de escolher os mais adequados à obtenção das superfícies próprias para crescimento de fibroblastos.

Os tratamentos de superfície podem ser divididos em três métodos principais: recobrimentos, tratamentos mecânicos e tratamentos químicos.

3.21.1 Recobrimentos

A aplicação de recobrimentos sobre a superfície dos substratos metálicos tem por finalidade aumentar a resistência na interface osso-implante, prevenir a liberação de íons, mascarar as contaminações da superfície causadas pelos processos de fabricação, além de produzir uma superfície porosa e rugosa.

O processo de recobrimento comumente utilizado é o de aspersão térmica de um pó metálico ou cerâmico que tem sido utilizado sobre os substratos de titânio. A técnica de aspersão térmica, *plasma spray* envolve altas temperaturas, mas mantém o substrato a uma média de 300°C, não induzindo alterações micro-estruturais nas superfícies analisadas [9].

3.21.2 Tratamentos Mecânicos

Os tratamentos mecânicos aos quais são submetidos os implantes visam à alteração da rugosidade e topografia da superfície. Pode ser obtido por jateamento com partículas duras de

óxidos de Ti, Al, ou Si e depois é recomendado um tratamento com ácido, para retirar possíveis incrustações de partículas de óxido e, também, para uniformizar a rugosidade criada pelo processo de jateamento.

Na usinagem, criam-se entalhes na superfície do implante que podem ser desde roscas até a criação de furos ou reentrâncias para que haja aposição de osso por entre esses entalhes [9].

3.21.3 Tratamentos Químicos

Resultados positivos na bioativação de superfícies com tratamentos químicos foram relatados, tais como passivação em ácido nítrico [91], tratamentos combinados de H₂O₂ e NaOH [10].

Autores [6] relataram em estudo do Nitinol após tratamento de superfície de NiTi com tratamento alcalino e oxidação por centelhamento, resultados avaliando a bioatividade e a resistência a corrosão em solução de Hanks balanceada.

As propriedades de bioatividade foram analisadas com base na composição química da amostra imersa na solução de Hanks, a 37°C ± 1°C com pH = 7,2 por 14 dias. A análise de AFM mostrou que o tratamento alcalino alterou a topografia da superfície. Análises ao MEV mostraram significantes diferenças na composição química das amostras e ainda que o tratamento alcalino resultou em um baixo ângulo de contato em monitoramento com água ultra pura. A resistência à corrosão por cratera foi analisada com base em registros de curvas de polarização anódica. Os resultados obtidos mostraram inadequabilidade do tratamento alcalino como pretensão a melhorar a bioatividade, porém o resultado da oxidação por centelhamento foi promissor em termos da química e da topografia.

Os tratamentos químicos com ácidos, anodização ou implantação iônica têm por objetivos principais a limpeza, a criação de rugosidade e ativação da superfície por meio da alteração estrutural da camada de óxido.

A anodização do NiTi tem sido um dos tratamentos de superfície mais pesquisados, pois trabalha-se com baixas temperaturas e obtem-se finas camadas. O processo temperatura-eletrólito tem se constituído em segredo industrial, por isso a escolha da anodização nesse trabalho para fazer o comparativo tratamento térmico *versus* tratamento eletroquímico. O processo de anodização desenvolvido nesse trabalho deverá ser patentado.

3.21.4 Anodização

A anodização é o processo mais comum de tratamento de superfícies que se baseia em tratamento a baixa temperatura para ligas NiTi que pode levar à formação de películas superficiais de óxido (20 nm), melhorando a resistência do material [5].

A anodização é um método eletroquímico capaz de produzir filmes com diferentes propriedades sobre superfícies de materiais. Algumas propriedades celulares como adesão, alterações morfológicas, proliferação e diferenciação são afetadas por essas propriedades apresentadas por materiais implantáveis em humanos. Dentre elas, destacam-se a composição, a rugosidade, a tensão superficial e a carga eletrostática do óxido de titânio [19, 92, 93]. Esse tratamento é feito com o objetivo de produzir uma camada de óxido estável e biocompatível sobre a superfície do substrato.

A nova camada de óxido formada é porosa e está firmemente aderida ao substrato, o que beneficia a resposta biológica do implante. Outra vantagem deste processo é a possibilidade de incorporar íons de cálcio e fósforo à superfície, através do controle da composição e concentração do eletrólito [94].

Alguns autores [95] realizaram anodização em ácido acético na superfície do NiTi para aumentar a espessura do filme de óxido e da resistência à corrosão. O comportamento do NiTi em ácido acético foi, marcadamente, diferente daquele encontrado em titânio. Foi obtido um filme de 20-25 nm. Concluíram que a anodização é um método de baixa temperatura para obter-se filmes de proteção no NiTi para implantes, considerando que o NiTi é muito sensível a tratamentos térmicos acima de 300°C. Concluíram ainda que o NiTi anodizado fica em torno de nove vezes mais protegido contra a corrosão que o NiTi bruto e que o ácido acético como um simples e eficiente método de baixa-temperatura para aumentar a resistência a corrosão em aplicações biomédicas.

Outros autores [12] relataram que o filme obtido no NiTi por anodização em ácido acético teve a relação atômica Ni/Ti em torno de 0,004 na superfície do filme anódico o que era muito menor que o valor de 0,30 obtido na amostra mecanicamente polida.

Tratamento com banho químico e conseqüente oxidação em solução aquosa fervendo, teve maior bioatividade, maior crescimento celular do que superfícies não-oxidadas [8].

O entendimento das células, com seu movimento em seu primeiro contato com a superfície mostram como ela pode se espalhar e aderir aos nanotubos formados pelo tratamento superficial.

3.22 Células: Osteoblastos, Osteócitos, Osteoclastos, Fibroblastos

Nessa Seção é mostrado sob o ponto de vista biológico o trabalho celular da composição e recomposição óssea, sua reabsorção e qual o comportamento celular frente a um corpo estranho, o implante, sendo ele inerte ou agressivo ao corpo humano.

Por mais perfeito que seja o implante, haverá uma agressão ao corpo ocasionando uma lesão que proporcionará uma resposta celular na interface osso-implante e tecidos circunvizinhos.

O entendimento do processo celular e do osso como tecido vivo, colabora na fabricação e aperfeiçoamento dos futuros implantes [90].

A Figura 14 mostra a célula humana com as organelas e o citoesqueleto.

Célula: núcleo, nucléolo, carioteca (envoltório do núcleo, membrana nuclear).

Citoplasma: membrana citoplasmática, citoesqueleto, organelas e inclusões. Citoplasma é o espaço entre a membrana plasmática e o núcleo. Esse espaço é preenchido por uma substância viscosa denominada citossol ou hialoplasma onde estão mergulhadas as organelas citoplasmáticas.

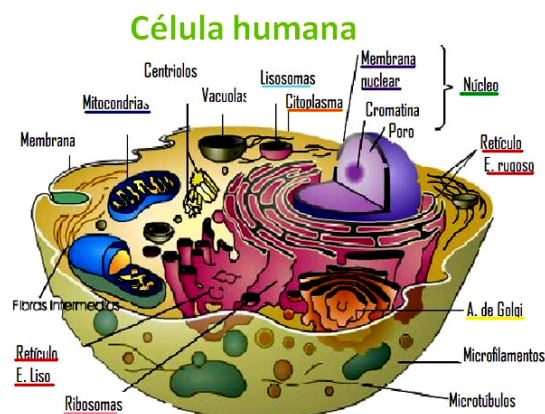


Figura 14: Célula humana [96].

3.22.1 Informações Básicas sobre Histologia Óssea

3.22.1.1 Colágeno

A proteína principal do tecido conjuntivo, responsável pelo arcabouço ou esqueleto dos órgãos e tecidos, bem como pela cicatrização [97].

3.22.1.2 Osteoblastos

Osteoblastos são as células provenientes das células osteoprogenitoras, são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, colágeno tipo I, proteoglicanos, glicoproteínas. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Os Osteoblastos localizam-se na superfície do osso. A matriz óssea calcifica-se e aprisiona os osteoblastos que se transformam em osteócitos. A matriz óssea se deposita ao redor da célula formando os canalículos, canais de Havers [78].

Quando os osteoblastos entram em estado de quiescência, deixam de produzir a matriz e se tornam células de revestimento ósseo.

Osteoblastos também secretam enzimas responsáveis pela remoção do osteóide (a matriz óssea recém-formada, adjacente aos osteoblastos ativos e que não está ainda calcificada) para que os osteoclastos possam entrar em contato com a superfície óssea mineralizada [98].

3.22.1.3 Osteoclastos

Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas que são responsáveis pela reabsorção da matriz óssea. Quando a membrana celular dos osteoclastos entra em contato com a matriz óssea formam-se projeções que constituem um bordo pelo qual entram íons hidrogênio para, assim, ser produzido um meio ácido que provocará a descalcificação da matriz óssea. Os osteoclastos degradam melhor o osso quando estão em contato com matriz óssea mineralizada e isso só é possível com o auxílio dos osteoblastos. Os osteoblastos produzem enzimas que degradam a camada não mineralizada da matriz permitindo, dessa forma, aos osteoclastos, um fácil acesso à matriz óssea mineralizada para degradarem-na.

Estas células se originam de precursores mononucleados provenientes da medula óssea que, ao contato com o tecido ósseo, unem-se para formar os osteoclastos multinucleados [78].

3.22.1.4 Reabsorção Óssea

Osteoclasto que faz a renovação do cálcio e destruição da matriz óssea (extracelular) o cálcio reabsorvido vai para o sangue.

Osteólise osteocítica: é o processo de transferência do cálcio do interior da massa óssea para o LEC (líquido extracelular) durante o processo de reabsorção óssea.

As depressões da matriz óssea escavadas pela atividade dos osteoclastos são conhecidas como lacunas de Howship.

Os fibroblastos foram escolhidos nesse estudo para teste de crescimento celular devido à classificação do Nitinol como material biotolerável. Estas células farão o encapsulamento do implante após a inserção.

3.22.1.5 Fibroblasto

O fibroblasto é a célula constituinte do tecido conjuntivo e sua função é formar a substância fundamental amorfa. É responsável pela biossíntese de colágeno do tipo I, formador de fibrilas, tendo o osso, pele, tendão, dentina como tecidos representativos. Produz substância intercelular e origina células de outros tecidos conjuntivos, são responsáveis pela regeneração.

Os fibroblastos sintetizam as proteínas, colágeno e elastina, além das glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular. Essas células estão também envolvidas na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo. As células com intensa atividade de síntese são denominadas de fibroblastos, enquanto as células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos [78].

3.22.2 Interação Célula-Substrato

A biocompatibilidade de um material está estreitamente relacionada com a resposta fisiológica da célula em contato com a sua superfície. Os fenômenos de interação entre células e substratos podem ser definidos de forma bastante abrangente, como mecanismos pelos quais as células são capazes de responder a estímulos do meio ambiente externo e como estes influenciam sua adesão, proliferação e diferenciação [99, 100]. Diversos autores consideram a “adesão” como um evento que envolve as primeiras horas de contato da célula com o substrato.

A maior parte dos mecanismos relacionados a esta interação é realizada por moléculas adsorvidas à membrana plasmática, uma vez que se encontra em contato com ambos o ambiente externo e interno da célula. São exemplos destas estruturas, adesinas, glicoproteínas, adesivas, proteínas formadoras de canais e todas as proteínas carreadoras (de transporte). A adsorção, a adesão e o espriamento pertencem à primeira fase da interação célula/material e engloba vários fenômenos até que a célula esteja adsorvida sobre o material. A qualidade desta fase influenciará a capacidade da célula proliferar e se diferenciar quando em contato com o implante [99, 101, 102].

3.22.3 Adsorção Celular

Ocorre rapidamente e é governada por propriedades físico-químicas das células (adesinas) com os materiais pela ação de forças interfaciais: eletrostáticas e Brownianas. Acompanhando o modelo do mosaico fluido da membrana plasmática, toda superfície celular também apresenta um mosaico de energias interfaciais e eletrostáticas. Considerando uma membrana plasmática de forma unificada e pressupondo a célula como um macro colóide, é possível determinar a carga eletrostática e a força interfacial líquida para uma dada superfície celular. Estas características, somadas ao efeito Browniano e a viscosidade do meio, podem determinar a adsorção ou repulsão celulares [103, 104].

3.22.4 Fixação Celular

A fixação celular é o processo pelo qual as células se ligam a biopolímeros ou a outras células por intermédio de interações específicas (como receptor-ligante e lectina-carbohidrato). A natureza desta interação consiste nas mesmas ligações químicas que prevalecem nas interações não-específicas: energia Browniana (quantitativamente constante e sempre repulsiva), interações de Lifshitz - D. Van der Waals (quantitativamente não muito importantes, mas sempre presentes em meios aquosos), elétron-receptor e doadoras (geralmente as mais importantes quantitativamente) e eletrostáticas (de importância variável, dependendo das partículas envolvidas) [103].

3.22.5 Adesão Celular

Este fenômeno é mediado por interações específicas do tipo receptor-ligante, mas com a diferença fundamental de que há o disparo de cascatas de sinalização intracelulares, que acarretam em mudanças fenotípicas da célula. Ocorre em período mais longo e envolve várias moléculas biológicas: proteínas de matriz extracelular (MEC), proteínas de membrana plas-

mática e proteínas do citoesqueleto que induzem sinais de transdução promovendo a expressão de fatores de transcrição, e, conseqüentemente, regulando a expressão do gene [99, 101, 102].

3.22.6 Os Lamelipodios estão envolvidos no Deslocamento Celular

Migração celular: depois que a célula estabelece seu primeiro contato com o substrato, ela inicia sua fase de espraiamento. Para migrar, a célula necessita de uma dinâmica interação entre o substrato e seu citoesqueleto. Após desenvolver e fixar seu lamelipodio (os lamelipodios são prolongamentos transitórios da membrana celular produzidas pela ação de microfilamentos de actina os quais pertencem ao citoesqueleto celular. Sua estrutura é larga e sua forma laminar) as células usam interações adesivas para gerar força e energia necessárias ao seu movimento, seguidos de seu descolamento e retração.

O citoesqueleto é uma rede complexa de micro túbulos, filamentos de actina (micro filamentos) e filamentos intermediários. Essas proteínas estruturais influem na forma das células e, junto com as proteínas motoras, possibilitam o movimento das organelas e vesículas citoplasmáticas. O citoesqueleto é responsável também pela contração celular e pelo movimento da célula inteira, como no movimento amebóide [78].

Certas células, como as amebas e os glóbulos brancos (leucócitos), apresentam a capacidade de deformar-se. Surgem, assim, pseudopodes (falsos pés), relacionados com a locomoção ou com a habilidade de fagocitar alimentos. A formação de pseudopodes depende de um movimento especial do hialoplasma celular, o movimento amebóide.

A matriz extracelular do osso é composta por 90% de proteínas colagenosas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não colagenosas (20% de osteocalcina, 20% de osteonectina, 12% de sialoproteínas ósseas, 10% de proteoglicanas, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas do osso, etc). Todas estas proteínas são sintetizadas pelos osteoblastos e a maioria está envolvida na adesão.

3.22.7 Proteínas de Adesão

As células de mamíferos nunca são encontradas de forma isolada no corpo, mas, sim, ligadas a outros componentes, celulares ou não, presentes no seu ambiente. A questão fundamental é: “Como elas se ligam entre si e de que forma elas podem se ligar a materiais não bio-

lógicos?” Esta interação, geralmente, envolve proteínas moleculares presentes na sua superfície.

As proteínas de adesão celular são, frequentemente, receptoras de transmembrana que atravessam a superfície da membrana celular e mantêm contato tanto com o espaço extracelular como com o espaço intracelular.

A parte extracelular da proteína de adesão pode aderir moléculas da superfície de uma célula adjacente (adesão célula-célula), ou a parte da matriz extracelular (adesão célula – MEC). A molécula que a proteína de adesão adere é chamada de ligante. As proteínas de adesão irão determinar indiretamente a subsequente interação bacteriana ou celular à superfície do material implantado, representado como uma inflamação ou uma resposta imune do hospedeiro respectivamente. A adesão celular ao biomaterial é determinada por um complexo de proteínas da matriz extracelular (MEC). A MEC é um complexo estrutural que cerca e suporta as células nos tecidos mamíferos, frequentemente referida como tecido conjuntivo. A MEC é composta por três classes de biomoléculas:

1. Proteínas estruturais como o colágeno e a elastina;
2. Proteínas especializadas como, por exemplo, a fibronectina, vinculina e a laminina;
3. Proteoglicanas que são compostas por proteínas que estão aderidas a longas cadeias de dissacarídeos chamados glicosaminoglicanas (GAGs).

O colágeno é a mais abundante proteína encontrada nos animais e o maior componente na MEC, possuindo pelo menos 12 tipos conhecidos. Predominantemente é sintetizado por fibroblastos, mas também pode ser sintetizado por células epiteliais.

É sabido que as células se aderem melhor a superfícies rugosas que lisas, que osteoblastos preferem superfícies mais rugosas e fibroblastos superfícies menos rugosas.

3.23 Caracterização de Implante NiTi

3.23.1 Topografia

A integração de implantes ao tecido ósseo “*in vivo*” está positivamente correlacionada com um aumento da rugosidade da superfície do implante. Osteoblastos humanos aderem melhor a superfícies rugosas que lisas [18, 99, 100, 102, 105, 106, 107].

A adesão é, geralmente, aumentada em superfícies com rugosidade média (Ra) em torno de 1 μm como a produzida, por exemplo, nos jateamentos (*sandblasting*) [105]. A rugosidade variando entre 0,8 μm e 1,90 μm aperfeiçoaria respostas celulares intermediárias e finais, mas não afetaria respostas iniciais e superfícies lisas não favoreceriam essa resposta [108].

Estudos recentes revelaram que osteoblastos se espalharam mais nas superfícies com baixa amplitude de rugosidade (buracos mais rasos). No entanto, mostraram uma alta força de adesão nas superfícies mais rugosas [102].

A rugosidade da superfície deve ser considerada não apenas em termos de amplitude, mas também de organização. Varias técnicas de tratamento produzem superfícies organizadas (isotrópicas) e desorganizadas (anisotrópicas) com a mesma amplitude. Experimentos mostraram uma baixa adesão celular ao substrato e baixa proliferação em superfícies caóticas. As células aderem menos a superfícies que apresentam muitas irregularidades devido à sua incapacidade de estabelecer área de contato suficiente com o substrato [99].

Desta forma, a topografia deve ser considerada em várias escalas: a escala acima do tamanho da célula (macro-rugosidade) e abaixo do tamanho das células (micro-rugosidade). Quando a topografia está abaixo do seu tamanho, as células apreciam a superfície mais lisa, quando está acima, elas apreciam uma rugosidade isotrópica formada por numerosos “ninhos” (*bowl-like nests*), que favorecem a adesão [105]. O efeito da topografia em escala nanométrica (abaixo de 1 μm) tem mostrado diferentes aspectos no comportamento celular. Os osteoblastos responderam, sinergicamente, à combinação da nano topografia com micro topografia, mostrando uma densidade celular significativa após três dias [15].

A orientação celular também é outro fenômeno importante causado pela topografia. Testes de migração celular em biomateriais com ranhuras na superfície demonstraram que células migram mais rapidamente em materiais com ranhuras mais profundas [109]. Porém, trabalhos mais recentes mostraram que ranhuras superficiais (rasas) induzem a orientação de grupos ou células individuais ao longo do seu eixo, levando os autores a concluir que o melhor parâmetro para a orientação da célula é a largura dos sulcos e não a sua profundidade. A importância destes estudos, é que os fibroblastos orientados tendem a mineralizar mais rapidamente, possibilitando assim, ósseo-integrações tecido/implante mais eficiente [17].

No desenvolvimento da pesquisa durante a obtenção das superfícies é necessário monitorar o ângulo de contato, pois é sabido que as células preferem superfícies mais hidrofílicas que superfícies hidrofóbicas.

3.23.2 Ângulo de Contato/Molhabilidade

A hidrofobicidade do material também exerce grande influência na adesão célula-superfície do material. Células aderem em maior quantidade sobre superfícies hidrofílicas [18, 19]. O ângulo de contato é definido como o ângulo formado na interface líquido-ar-superfície. Especificamente, é o ângulo formado entre um plano tangente a uma gota do líquido num plano contendo a superfície, onde o líquido se encontra depositado, consoante ao esquematizado na Figura 15 [110].

Definição do ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. Na Figura 15, γ_s e γ_{LV} são a energia de superfície do sólido e a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor, respectivamente; γ_{SL} é a energia da interface sólido – líquido.



Figura 15: Ângulo de contato/molhabilidade [110].

A molhabilidade é um parâmetro que indica o quanto um líquido pode se espalhar sobre uma superfície. Quando uma gota líquida é depositada sobre uma superfície horizontal, a molhabilidade estará ligada ao comportamento do ângulo de contato entre a linha tangente à superfície do líquido e esta superfície horizontal. Ângulo de contato acima de 90 graus, a superfície não molha, e a chamamos hidrofóbica; se o ângulo fica abaixo de 90 graus a superfície molha, caso em que é chamada de hidrofílica. Quanto menor o ângulo formado entre a gota e o substrato, mais hidrofílica será a superfície [103, 104, 111].

Na Figura 16 é apresentada uma representação esquemática do ângulo formado entre a gota e a superfície: A) hidrofóbica; B) hidrofílica.

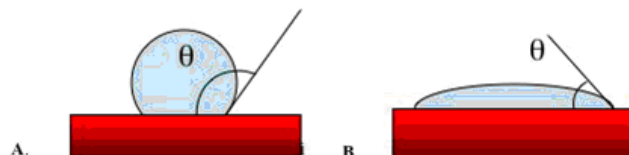


Figura 16: Representação hidrofóbica e hidrofílica. (A) hidrofóbica; (B) hidrofílica [112].

3.23.3 Energia de Superfície

A energia de superfície pode influenciar a adsorção de proteínas e seu rearranjo estrutural sobre o material [99, 113]. Os sítios superficiais disponíveis à adsorção de proteínas são formados, basicamente, por afinidades químicas que se refletem na energia de superfície. A aproximação celular também é dirigida, em parte, pela energia de superfície por meio dessas afinidades químicas.

O conceito de energia de superfície pode ser compreendido usando um líquido como exemplo. Átomos e moléculas do líquido podem se mover, livremente, procurando ocupar uma posição de menor energia potencial. Ou seja, um lugar onde as forças (atrativas e repulsivas), agindo em todas as direções estejam em equilíbrio. Por outro lado, as partículas na superfície do material experimentam apenas forças dirigidas para dentro do líquido (Figura 17). Devido a isto, as superfícies são sempre regiões de maior energia. A diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior do material denomina-se energia de superfície ou tensão interfacial [103]. A Figura 17 mostra forças atuando em átomos ou moléculas no interior e na superfície de um material.

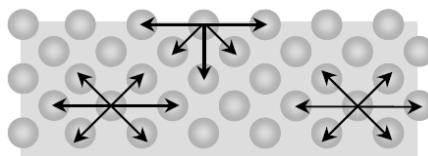


Figura 17: Representação esquemática da energia de superfície [103].

3.23.4 Composição Química

A variação na composição química da superfície do implante afeta a adesão e proliferação celular. Os efeitos positivos *in vitro* podem ser devido à incorporação de íons fosfato ou ambos os cálcios e fosfatos, moléculas que podem penetrar na membrana celular ou ativar receptores de membrana. A presença de íons cálcio foi relatada como sendo vantajosa ao crescimento celular, melhorando a superposição óssea à superfície do implante [114].

3.24 Técnicas de Caracterização de Superfícies

As superfícies dos implantes devem ser caracterizadas quanto à sua composição química, a topografia e sua resposta aos tecidos. As técnicas de caracterização da composição

química avaliam o grau de pureza do metal e a presença de contaminantes provenientes do processo de fabricação, limpeza e esterilização.

3.24.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

O microscópio eletrônico foi desenvolvido no início dos anos 30, pelo alemão Ernest Ruska. Esse instrumento utiliza feixes de elétrons e lentes eletromagnéticas, no lugar da luz e das lentes de vidro, permitindo ampliações de até um milhão de vezes. Há três tipos básicos de microscópios eletrônicos: o de transmissão (para observação de cortes ultrafinos), o de varredura (para observação de superfícies) e o de ponto de prova (para visualização de átomos) [115].

O MEV pode formar imagens a partir de diversos mecanismos de contraste. Os mais utilizados são: contraste de número atômico (ou composicional) e o contraste topográfico. O contraste topográfico é o mais utilizado e é próprio para superfícies que contêm relevo. Utiliza sinais produzidos pelos elétrons secundários, que são elétrons com baixa energia, oriundos da superfície da amostra permitindo visualização de detalhes topográficos com elevada definição [116].

3.24.2 EDS - Energy Dispersion Spectrography (Espectrografia por Dispersão de Energia)

Nessa técnica, um detector semicondutor é posicionado de tal forma que a maior quantidade de raios X emitidos pela amostra seja coletada por ele [117]. O sinal emitido pelo semicondutor é proporcional à energia do fóton de raios X incidentes. O esquema de detecção consiste em raios X que atravessam uma janela de berílio e produzem um par elétron-lacuna em um cristal de silício dopado com lítio. A corrente gerada é processada em um sistema eletrônico e encaminhada para um analisador multicanal, onde são acumuladas as contagens correspondentes à energia de cada fóton processado. Esta contagem é representativa da proporção de cada elemento presente e dá origem a um espectro. Desta forma, esta técnica permite a identificação dos elementos químicos constituintes da região analisada [118].

3.24.3 Microscopia de Força Atômica

Inicialmente, a amostra é colocada sobre um piezo elétrico, um dispositivo que sofre deslocamentos micrométricos quando uma tensão é aplicada entre seus terminais. Uma área desta amostra é varrida por uma agulha (*probe tip*) e a contínua interação desta com a superfí-

cie gera tensões que movimentam o piezoelétrico. Um feixe de *laser* incidindo sobre o braço (*cantilever*) da agulha é refletido para um detector que, por sua vez, gera um sinal, o qual é captado pelo sistema computacional para transformá-lo numa micrografia (imagem) [119].

3.24.4 RBS - Espectroscopia de Retro Espalhamento de Rutherford

A técnica de RBS consiste em medir a energia de partículas de um feixe monoenergético que sofreram colisões com os átomos do alvo que se quer analisar e que foram retro espalhadas. Durante a colisão, os íons incidentes perderão energia por colisões com os átomos do material sendo que a taxa de redução de energia da partícula retro-espalhada depende da razão das massas da partícula incidente e do átomo alvo. Isto permite identificar qual a massa dos átomos do alvo e, portanto, qual elemento químico correspondente.

Sabendo-se qual é a identidade do átomo alvo, a sua densidade em átomos/cm² pode ser determinada pela probabilidade de colisão entre as partículas incidentes e os átomos do alvo.

A distância relativa à superfície onde ocorreu a colisão pode ser inferida a partir da perda de energia da partícula durante seu trajeto dentro da amostra. Desta maneira é possível estabelecer uma escala de profundidade com a energia das partículas espalhadas (as partículas que foram espalhadas na superfície têm energia maior que as espalhadas no interior do filme).

3.24.5 Espectroscopia Raman

Quando uma molécula é irradiada, a energia pode ser transmitida, absorvida, ou espalhada. A espectroscopia Raman é baseada na detecção da luz espalhada. No espalhamento Rayleigh, a interação da molécula com o fóton não provoca mudanças nos níveis de energia vibracional e/ou rotacional da molécula. Assim, o efeito Raman pode ser explicado pela colisão entre o fóton incidente e a molécula. Isto muda os níveis das energias vibracional e/ou rotacional da molécula. Pela lei de conservação de energia, isto significa que as energias dos fótons incidentes e espalhado serão diferentes [120].

3.25 Lavagem Ultrassônica

As lavadoras ultrassônicas têm o princípio de funcionamentos com transdutores piezoelétricos que convertem a energia elétrica em ondas mecânicas, formando cavitações em que ocorre uma rápida formação e violenta implosão de minúsculas bolhas no líquido de limpeza.

A agitação, devido às incontáveis implosões, cria um efetivo “esfregamento” das superfícies mais profundas e, também, nas mais expostas imersas na solução aquosa. As lavadoras ultrassônicas trabalham com frequências entre 20 e 40 kHz, sendo apropriadas à limpeza de equipamentos cirúrgicos, odontológicos e de joalheria. Os implantes, assim, como os instrumentos que fazem parte da cirurgia, passam pelo setor Centro de Materiais e Esterilização, que ficam junto ao centro cirúrgico. Neste setor, os materiais e instrumentos são embalados e submetidos à esterilização. A importância dessa fase da pesquisa é devido à comprovação que o material-implante não sofrerá danos ou transformações quando submetidos à pressão e temperatura, antes de chegar ao paciente.

3.26 Embalagem

Papel para Esterilização: embalagem flexível destinado ao mercado odonto-médico-hospitalar composta por filme laminado poliéster e polipropileno (PET/PP 57 g/m²) e papel grau cirúrgico 60 g/m² de selagem direta, impresso com dois indicadores químicos para monitoração do processo de esterilização óxido de etileno e autoclave a vapor. O papel grau cirúrgico cumpre com as exigências da norma NBR 12946/14707.

3.27 Esterilização em Vapor Saturado e Óxido de Etileno

A autoclave a vapor nos hospitais, clínicas e laboratórios é o aparelho mais utilizado para esterilização. Tem como parâmetro a eliminação da bactéria *stearothermophilus* que é o indicador biológico de garantia da esterilização. Outro indicador é o teste *Bowie & Dick* que mostra a total eliminação de ar da câmara interna feita pela bomba de vácuo.

Nesse equipamento as peças e os instrumentos destinados às cirurgias são submetidos a uma temperatura entre 121°C a 134°C com pressão de 1,5 a 1,7 kgf/cm² por determinado tempo e no caso de peças metálicas 30 minutos.

Os efeitos da autoclavagem a vapor foram relatados por [84] como não tóxicos.

Para esterilização das amostras destinadas a crescimento celular foi utilizado esterilização a óxido de etileno. Processo a 52°C, 1,5 kgf/cm², 2 horas de exposição e 7 horas de aeração. O parâmetro dessa esterilização é a eliminação do indicador biológico, *Bacillus Subtilis*.

3.28 Radiação Gama

A radiação gama – Cobalto 60 tem sua ação esterilizante na alteração molecular das células, as quais sofrem perdas ou adições de cargas elétricas (ionização), ficando carregadas positiva ou negativamente. A energia eletromagnética derivada de cobalto é a que se utiliza com maior frequência na esterilização dos materiais por irradiação e é obtida através de raios gama cobalto a 60°C. É um método eficaz e oferece como vantagens ser altamente penetrante, atravessando o invólucro dos materiais embalados em não-tecido ou papel grau cirúrgico e não danifica o material submetido ao processo por ser frio [121].

3.29 Adesão Celular na Superfície Oxidada da liga NiTi

YING et al. 2011 [122], relataram em teste “in vitro” de toxicidade, que a liga NiTi oxidada por processo químico possui iguais propriedades de ativação celular que o titânio puro. Em comparação a peças não-oxidadas, as oxidadas mostraram melhores respostas ao crescimento celular. Relata ainda que a oxidação da superfície aumenta sua bioatividade. Foram utilizadas nesse experimento células tipo L929 (A linhagem celular L929, de fibroblastos é citada para testes de toxicidade, é um subclone da linhagem parenteral L. Essa linhagem é derivada do tecido aureolar subcutâneo e adiposo de um camundongo macho CH₃/Na de 100 dias) [123].

O teste de citotoxicidade é um dos testes comprobatórios da biocompatibilidade. Neste teste é verificado se a superfície do implante oferece impedimento ao crescimento celular.

3.30 Teste de Citotoxicidade

Conforme autor [124] descreveu a avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT, conforme mostra a Figura 18.

3.30.1 Princípio

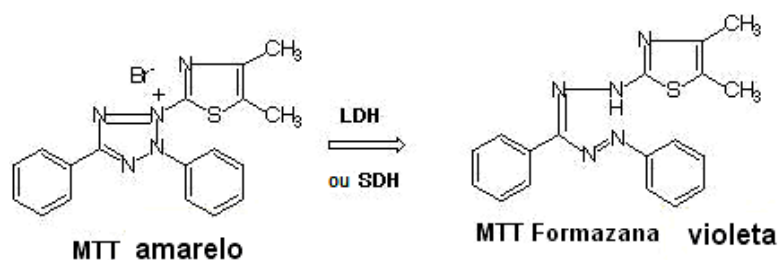


Figura 18: Princípio da Técnica MTT [124].

3.30.2 Amostra

Células aderentes cuja viabilidade celular deseja-se avaliar após o seu tratamento.

3.30.3 Reagentes/soluções/suspensão celular

Meio de cultura completo: meio DMEM alto teor de glicose suplementado com soro fetal bovino (10%) e solução de antibióticos penicilina 10.000 u/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL (1%). A metodologia do teste MTT é mostrada na Tabela 6.

Solução de MTT (0,5 mg/mL) - Preparo de 10 mL.

Peso de 5 mg do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]}/ adicionado 1 mL de PBS/ adicionado 9 mL de meio de cultura completo.

3.30.4 Procedimento

Preparar uma suspensão celular na concentração de $0,5 \times 10^5$ células/mL.

Tabela 6: Metodologia para teste de MTT (Metiltetrazolium).

Etapa	Procedimento
(a)	Retirar o meio de cultura da garrafa
(b)	Lavar a garrafa com PBS
(c)	Adicionar a tripsina
(d)	Esperar tripsina reagir
(e)	Preparo do meio de inativação
(f)	Inativar a tripsina até reagir
(g)	Divisão do conteúdo da garrafa em dois tubos falcon
(h)	Centrifugar células
(i)	Retirar meio com tripsina
(j)	Ressuspender as células em meio simples
(k)	Contar células

A Figura 19 mostra o ciclo de cultura, na estufa, e a Figura 20, o ciclo operacional do teste MTT.

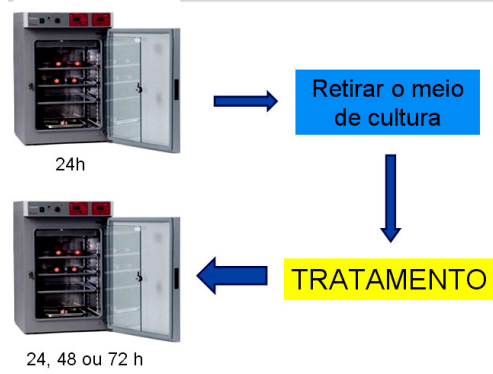


Figura 19: Ciclo de cultura [124].

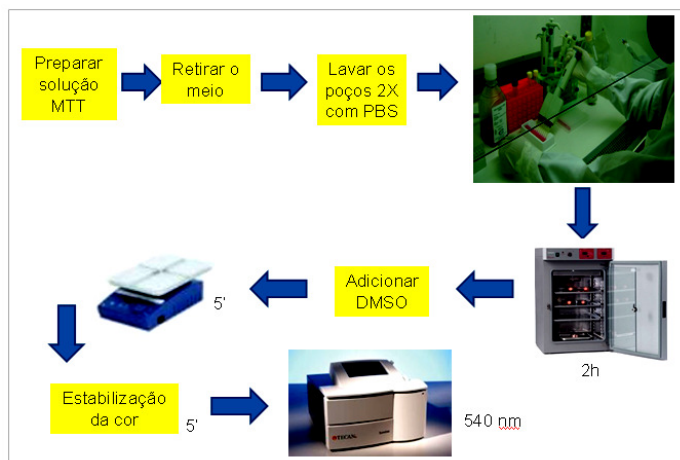


Figura 20: Ciclo operacional do teste MTT [124].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Grampos em NiTi para Tórax Instável

O grampo foi desenhado com comprimento de 53,0 mm, podendo ser ampliado para quaisquer dimensões de arcos costais.

O desenho com dimensões em milímetros do grampo tipo Judet em NiTi é mostrado na Figura 29 da seção seguinte. (Patente de Invento n°. 1003420-0).

O diagrama de blocos da Figura 21 mostra as principais etapas da pesquisa. Após o corte das chapas a pesquisa desenvolveu-se em duas etapas, corte em formato de grampos tipo Judet para testes de tratamento térmico para observar recuperação de forma em temperatura de austenitização e corte de tiras para realização de estudos de superfícies.

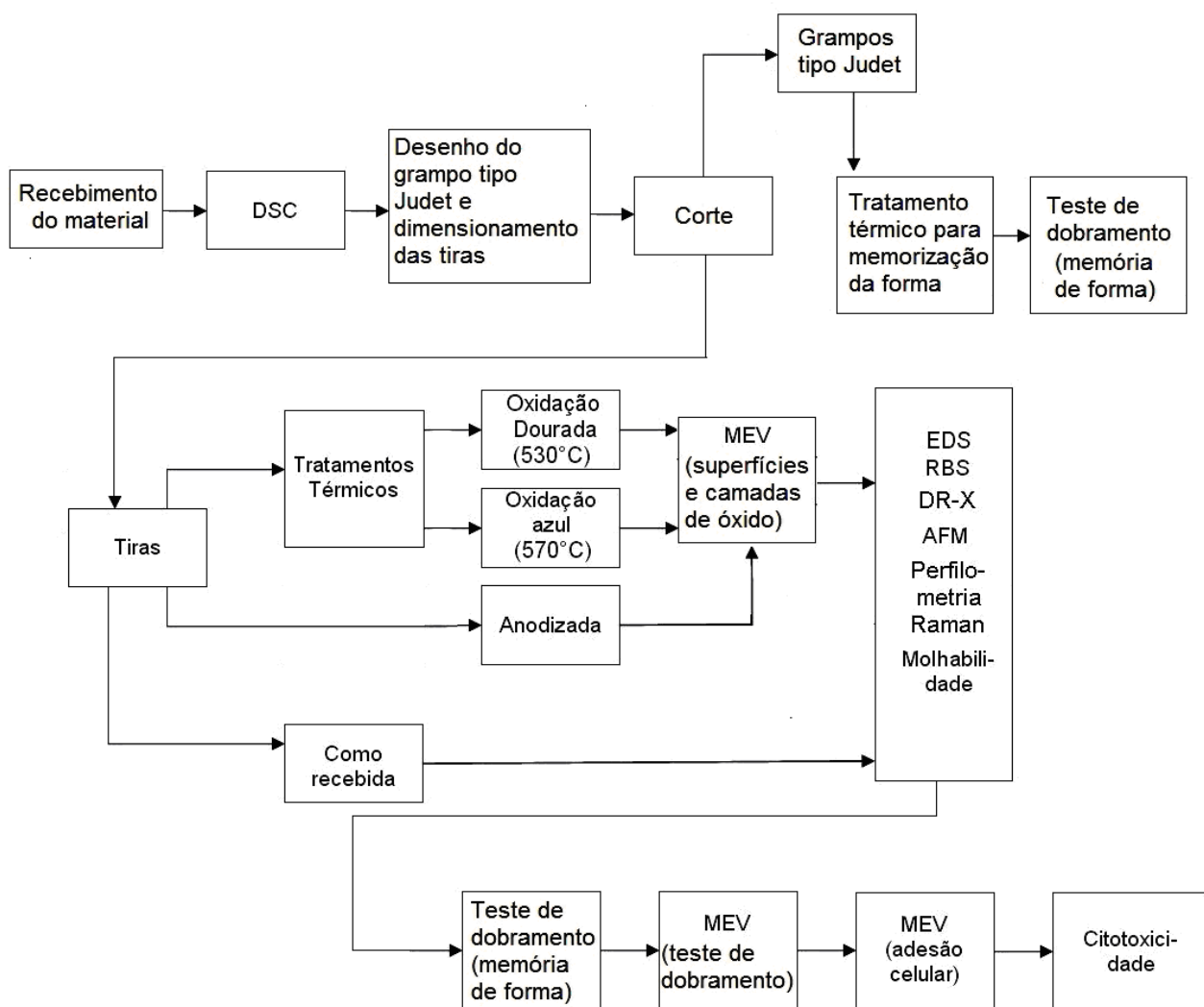


Figura 21: Diagrama de blocos do ciclo operacional.

4.2 Preparação do Substrato para a Caracterização das Superfícies

A liga superelástica, aproximadamente, equiatômica NiTi (Ni 55.8 wt%) usada nesse estudo foi fornecida pela empresa Shangai HeHe Trading Co. da China.

Amostras de Nitinol foram cortadas em EDM, Electric Discharge Machining. As dimensões das amostras para testes foram 4,0 mm X 34,0 mm e 0,5 mm em espessura. As amostras foram, então, desengraxadas em lavadora ultrassônica primeiramente com acetona por 20 minutos e, após, com 70% etanol por 20 min. Na sequência, uma lavagem com água destilada. Antes da cultura de células as amostras foram esterilizadas por irradiação- γ (gama), a fonte foi cobalto 60 (2500 Gy).

4.2.1 Corte das tiras em equipamento EDM

Equipamento: eletro-erosão a fio. (EDM – *Electric Discharge Machining*), conforme fluxograma da Figura 22.

Descritivo de corte: as tiras foram justapostas para corte na máquina de eletro-erosão a fio. Após o corte as tiras foram deixadas imersas em água deionizada por 30 segundos. Depois, as tiras passaram por secagem à temperatura entre 22°C e 23°C. Em momento posterior à secagem, foram embaladas em papel toalha e armazenadas em embalagens poliméricas com sílica.

A manipulação das tiras foi realizada com pinça polimérica e luvas de procedimento, evitando que fossem riscadas e/ou contaminadas.

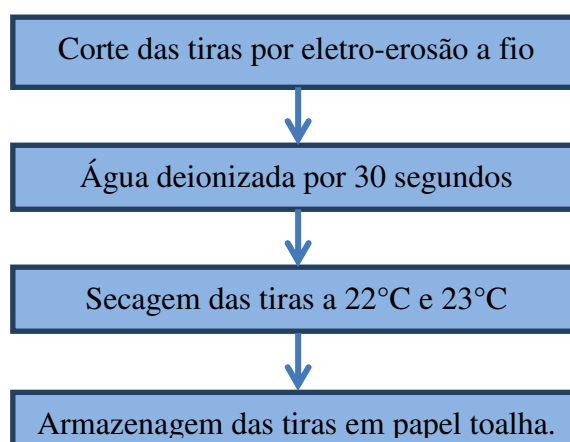


Figura 22: Fluxograma do processo de corte de tiras em EDM.

Depois de cortadas, as tiras foram destinadas para tratamentos térmicos e anodização.

4.2.2 Tratamento Térmico

Os tratamentos térmicos para obtenção dos óxidos foram realizados com as mesmas temperaturas de memorização [43, 125]. Esses tratamentos foram realizados sobre as tiras retangulares para caracterização de superfície. O tratamento térmico sobre os grampos Judet com intuito de verificar a memória de forma foi realizado em estudo anterior, na dissertação de mestrado do autor [2], demonstrando satisfatoriamente essa propriedade. Entretanto como houve modificações no desenho para grampos tipo Judet, foram realizados novos tratamentos térmicos com estes grampos.

Os equipamentos empregados para o tratamento térmico foram: forno do tipo mufla, molde de forno, gases refrigerantes tetrafluoretano 134a, pentafluoretano 404a e nitrogênio líquido.

As peças, tiras e grampos do tipo Judet, foram resfriadas com gases refrigerantes em temperatura abaixo de M_f para serem levadas ao forno, para obtenção da forma austenítica memorizada, “*parent shape*” ou também chamada *forma pai* na literatura.

Os grampos com molde Figura 25, foram submetidos a aquecimento em 530°C , por 06 minutos e 570°C por 20 minutos e resfriados em água a temperatura ambiente, para memorização de forma. O tratamento térmico foi realizado ao ar.

4.2.3 Ciclo de Tratamento Térmico empregado para memorizar forma no grampo tipo Judet

Material auxiliar: molde com inserto e gás refrigerante, conforme Figura 23, Figura 24 e Figura 25. Na Figura 23 são mostrados os gases utilizados na pesquisa: 304 a para temperaturas de transformação de fases com M_f até -26°C e gás 404 a para temperaturas transformação de fases com M_f até -42°C . Na Figura 24 são mostrados o grampo cortado com garras espaçadas e o molde para dar forma ao grampo. Na Figura 25 são mostrados o grampo cortado inserido no molde e o dobramento do grampo no molde.



Figura 23: Gases refrigerantes, tetrafluoretano 134 a e pentafluoretano 404a.

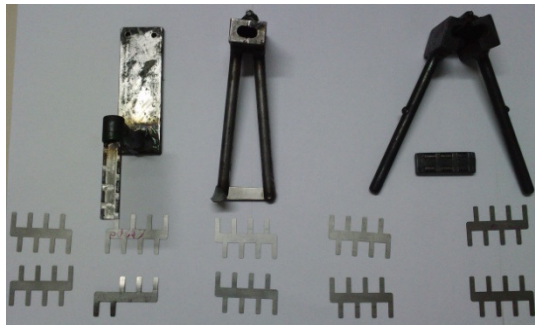


Figura 24: Grampos cortados e molde de forno.

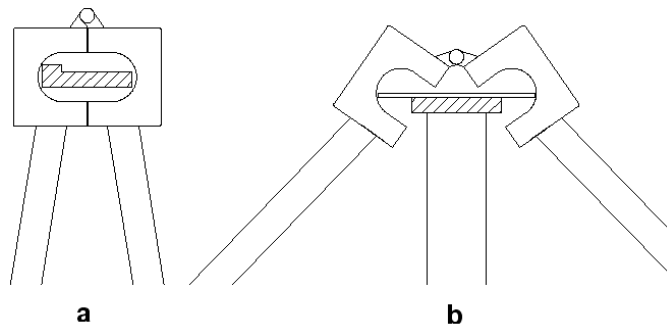


Figura 25: Desenho do molde de forno. (a) Desenho do molde de forno fechado com grampo e (b) em detalhe aberto com grampo.

O ciclo de tratamento térmico dos grampos pode ser descrito conforme etapas a seguir:

- (1) O grampo foi resfriado a -196°C com Nitrogênio líquido.
- (2) O molde foi resfriado a -196°C com Nitrogênio líquido.
- (3) O grampo foi colocado conformado no molde. O molde foi fechado com o grampo.
- (4) O molde com grampo foi levado ao forno de mufla a 530°C , 06 minutos e 570°C por 20 minutos.
- (5) O conjunto foi resfriado em água com temperatura ambiente.

- (6) O molde foi aberto e retirado o grampo com sua forma memorizada.
- (7) O grampo foi levado ao resfriamento novamente a -196°C para ser estirado na forma reta.
- (8) O grampo foi colocado em temperatura de 37°C .
- (9) O grampo readquiriu sua forma memorizada a partir do contato com a temperatura ambiente.

O tratamento térmico das tiras foi feito com as mesmas temperaturas, no entanto, sem emprego do molde já que a finalidade era o estudo das superfícies sendo as amostras mantidas como tiras planas. Ou seja, as amostras em tiras, também foram tratadas a 530°C e a 570°C ao ar, e resfriadas em água a temperatura ambiente, visando à obtenção de superfícies mais ricas em titânio e/ou mais pobres em níquel. As amostras avaliadas são mostradas na

Tabela 7: Amostras.

Amostras	Descrição
Como-recebida	Amostra como recebida do fornecedor.
Óxido azul	Tratamento térmico a 570°C , 20 min. rampa de aquecimento $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$. leito de alumina, resfriamento em água.
Óxido dourado	Tratamento térmico a, 530°C , 06 min. rampa de aquecimento $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$. leito de alumina, resfriamento em água.

4.2.4 Tratamento Superficial por Anodização

Amostras retangulares de Nitinol (tiras) com dimensões aproximadas de 4,0 X 32,0 X 0,5 mm foram manualmente lixadas com lixas de granulometria decrescente de 200 até 2000. Depois disso, as amostras foram, então, anodizadas usando uma solução ácida livre de fluoretos como eletrólito (formulação em processo de patente), tensão elétrica de 60 V, temperatura de 25°C sob agitação. O tempo de anodização foi de 10 minutos para a amostra chamada AN10 e 30 minutos para a amostra chamada AN30. Amostra sem tratamento de superfície, também lixada e polida foi usada para comparação e denominada “como-recebida”.

A Tabela 8 mostra a descrição dos tratamentos de superfície das amostras AN10, AN30 e “como recebida”.

Tabela 8: Descrição das amostras estudadas na anodização.

Amostras	Descrição dos tratamentos de superfície
Como-recebido	Sem tratamento.
AN10	Eletrólito livre de fluoretos; 60 V, 25°C, agitado; 10 minutos.
AN30	Eletrólito livre de fluoretos; 60 V, 25°C, agitado; 30 minutos.

4.2.5 Lavagem Ultrassônica das tiras após tratamento superficial (tratamento térmico ou anodização) para posterior teste de crescimento celular e toxicidade

Foi realizada uma limpeza em lavadora ultrassônica das tiras de Nitinol usadas nos testes para crescimento de células e toxicidade conforme fluxograma mostrado na Figura 26.

Descritivo da lavagem: as tiras foram colocadas em um béquer de vidro de 50 mL, contendo 30 mL de álcool etílico comercial. Após o béquer foi colocado no banho ultrassônico durante 1 minuto. Passado esse tempo, retirou-se o béquer do banho. Posteriormente as tiras foram retiradas do álcool etílico, secando a temperatura entre 22°C e 23°C. Após a secagem, as tiras foram embaladas em papel e armazenadas em sacos plásticos com sílica.

A cada troca de grupos de tiras, o álcool etílico foi trocado, evitando possíveis contaminações. A manipulação foi feita com o uso de luvas de procedimento.

As tiras limpas após banho ultrassônico foram armazenadas em novos papel-filtros, evitando o contato com o papel anterior.

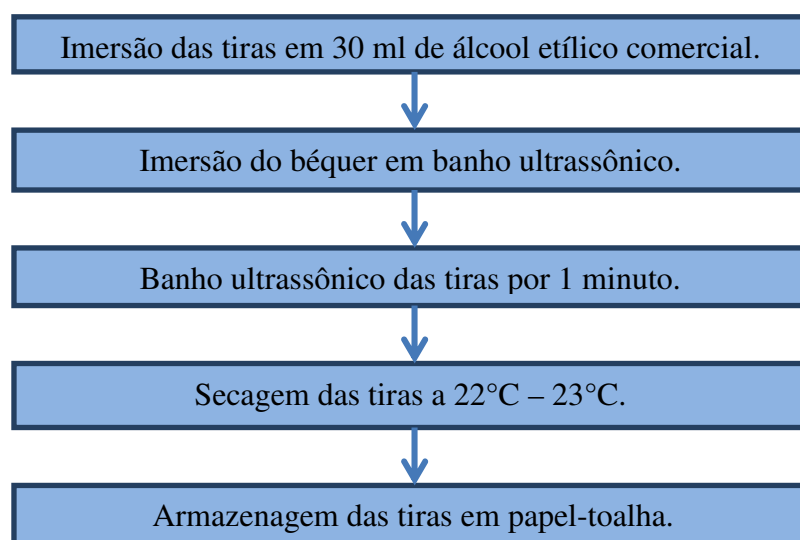


Figura 26: Fluxograma da lavagem ultrassônica.

4.3 Caracterizações das amostras

4.3.1 DSC – Calorimetria diferencial de varredura

O substrato de Nitinol como-recebido foi caracterizado quanto à temperatura de transformação de fases usando um calorímetro diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimeter*), DSC Q 20 V 24.2 Build 107, com atmosfera de proteção de nitrogênio. As amostras foram preparadas com corte do material em filamentos de, aproximadamente 5 mm de espessura de tal modo que a massa total correspondesse a no máximo 10,0 mg. A amostra foi colocada em cadinho de alumínio selado. As taxas de aquecimento e resfriamento foram reguladas para 10°C por minuto e o início e o final de temperatura foram regulados em -80°C a 110°C.

4.3.2 RBS (Espectrometria de Retroespalhamento de Rutherford).

A análise de RBS (*Rutherford Backscattering Spectroscopy*) foi usada para determinar a composição superficial das amostras. A análise RBS foi realizada usando um feixe de He⁺ a 2 MeV produzido por um acelerador TANDEM de 3 MV. Em todos os casos, a incidência do feixe foi perpendicular à superfície da amostra e o ângulo de detecção foi de 165° na direção do feixe.

4.3.3 Difração de Raio X

A análise de Difração de Raio-X com incidência em ângulo rasante foi realizada para identificar os compostos (as fases) presentes na superfície das amostras após tratamento superficial. As análises foram realizadas com ângulo de inclinação de 5°, com anodo de cobre, potencial aplicado de 40 kV e corrente de 20 mA. O software X'Pert High Score foi usado para a análise dos resultados e comparações com a base de dados do *standard spectra*.

4.3.4 Espectroscopia Raman

Para análise de espectroscopia Raman, foi usado o equipamento Renishaw em Via Spectrometer System com *laser* de 514 nm. A aquisição de dados e tratamento foram feitos com o Wire software. Essa análise foi empregada para avaliação da composição superficial das amostras, associada à análise de RBS e difração de raios-X.

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As características das amostras foram determinadas no que diz respeito à morfologia, por imagens obtidas e por microscopia eletrônica de varredura em um microscópio modelo JSM-5800 – Jeol. Três diferentes áreas por amostra e três amostras de cada tratamento foram examinadas sob diferentes magnitudes. As amostras também foram avaliadas por MEV após o dobramento das amostras para verificar a integridade das superfícies (presença de trincas, fissuras ou descontinuidade da camada obtida após tratamento superficial).

4.3.6 EDS – Espectrografia por dispersão de energia (Energy Dispersion Spectrography)

Espectrografia por Dispersão de Energia (EDS) também foi empregada para determinar qualitativamente os elementos químicos presentes na superfície das amostras.

4.3.7 Microscopia de Força Atômica (Atomic Force Microscopy - AFM)

A microscopia de força atômica é uma importante ferramenta para avaliar a morfologia e determinar a rugosidade em superfícies nanoestruturadas. No presente trabalho foi usado um microscópio SHIMADZU SPM – 9500J3 para análise das amostras e áreas com 125 μm x 125 μm foram varridas com ponteiros Si_3N_4 (NANOSENSORS). As amostras foram analisadas em quatro regiões aleatórias no modo contato. A rugosidade das superfícies foi determinada de acordo com os parâmetros: Ra (média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento, dos pontos de perfil da rugosidade em relação à linha média dentro do percurso de medição), Rz (média aritmética dos cinco valores de rugosidade parcial, considerando os pontos de maior afastamento, acima e abaixo da linha média) e Rms (rugosidade quadrática média).

4.3.8 Perfilometria de Contato

Um perfilômetro de contato (CETR-PRO5003D) foi usado para avaliar a rugosidade da superfície do substrato. Quatro espécimes de cada amostra (como-recebida, óxido azul, óxido dourado, anodizado) foram aleatoriamente selecionados para análise (cinco medidas por espécime). Os parâmetros de rugosidade determinados foram: a rugosidade média Ra (μm); a média aritmética dos cinco valores de rugosidade parcial considerando os pontos de maior afastamento, acima e abaixo da linha média, Rz (μm).

4.3.9 Molhabilidade

A molhabilidade das superfícies foi determinada pelo ângulo de contato em um equipamento desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisas em Corrosão - LAPEC na UFRGS. Com esse equipamento foi possível determinar o ângulo de contato entre a gota da solução PBS (*phosphate buffered saline*, 91,3:1,8:2,8:1 NaCl:KCl:Na₂HPO₄:KHPO₄) e o substrato analisado. Um software foi usado para determinar o ângulo de contato a partir da análise de imagens. A superfície pode ser considerada com comportamento hidrofóbico quando o ângulo medido é maior que 90°. Para ângulos com valores menores que 90°, a superfície pode ser considerada hidrofílica [126].

4.4 Cultura de Células

As amostras empregadas para os testes de citotoxicidade e adesão celular estão listados na Tabela 9.

Tabela 9: Sistemas pesquisados.

	Citotoxicidade	Adesão Celular
Anodizada AN10	4 amostras (tiras)	4 amostras (tiras)
Oxidação Azul	4 amostras (tiras)	4 amostras (tiras)
Oxidação Dourada	4 amostras (tiras)	4 amostras (tiras)
Como Recebida	4 amostras (tiras)	4 amostras (tiras)

Para avaliar a biocompatibilidade e citotoxicidade do material foi usada a linha de fibroblastos BHK (*Baby Hamster Kidney*) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As mesmas foram cultivadas sob condições padronizadas: DMEM Meio, complementada com 10% *Bovine Fetal Serum* (BFS), soro fetal bovino e 1% Penicilina/Streptomicina, mantido em forno umidificado com 5% CO₂ a 37°C.

As amostras foram colocadas em cultura de células com 5x10⁵ BHK células/poço e mantidas sob condições padrões de cultura por 72 horas.

Depois da cultura as amostras foram preparadas para análise em MEV de acordo com o seguinte protocolo:

Fixação com solução constituída por elementos conforme Tabela 10.

Tabela 10: Fixação.

Elementos	Volume
Glutaraldeído 25%	1,2 ml
Tampão Fosfato 0,2 M	5,0 ml
H ₂ O destilada	3,8 ml

A fixação das células foi realizada por imersão dos espécimes nessa solução depois da cultura de células e o período de fixação de uma semana.

4.4.1 Lavagem

Fosfato 0,2 M + H₂O destilada na proporção de 1:1.

O material deve passar por três lavagens de 30 minutos cada de acordo com o processo da Tabela 11.

Tabela 11: Desidratação.

Solução de Acetona/H₂O	Tempo
Acetona 30%	10 min
Acetona 50%	10 min
Acetona 70%	10 min
Acetona 90%	10 min
Acetona 90%	20 min
Acetona 100%	10 min
Acetona 100%	20 min

4.4.2 Dessecação

Aparelho de Ponto Crítico. Após o Ponto Crítico, as peças são colocadas no *Stub*, com o auxílio de uma lupa, para facilitar a visualização da área de interesse.

4.4.3 Metalização

Esta etapa é feita na metalizadora, onde o material torna-se condutivo por meio de deposição de um metal sobre a amostra.

4.4.3.1 Processo de Metalização

As amostras foram submetidas à metalização em ouro na metalizadora *Desk V - Standard*. Trabalho realizado no Laboratório de Estudos Avançados em Materiais na Universidade Feevale em Novo Hamburgo - RS. A metalização é feita com ouro, durante 2 minutos, a 28 miliampères, com uma taxa de deposição de, aproximadamente, 1,08 Å/s, a 0,070 Torrìcelli.

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Superfícies Cultivadas com Fibroblastos

Trabalho realizado no MEV da PUCRS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).

4.4.5 Viabilidade Celular: ensaio MTT

Avaliação de citotoxicidade pelo método de redução MTT (metiltetrazolium).

A absorção do sal MTT {[3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyletrazolium] bromide} pelas células, sendo reduzidas no interior da mitocôndria por um produto chamado formazan, que indica a viabilidade celular.

Depois da absorção do sal MTT, o MTT foi removido e 400 µL do solvente DMSO foi aplicado para os precipitados de formazan, subsequentemente, a placa foi agitada por 30 minutos para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância dos cristais de formazan, diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, foi lida usando uma leitora de ELISA Spectra Count com um comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram realizados em triplicata e, subsequentemente, normalizados de acordo com a (Equação 1).

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância da célula-amostra} - \text{Absorbância (branco)}}{\text{Controle positivo da Absorbância da célula} - \text{Absorbância (branco)}} \times 100$$

(Equação 1)

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Grampos tipo Judet: projeto

O grampo Judet (Figura 27) foi desenhado para aplicação em Nitinol conforme mostra a (Figura 28) do grampo tipo Judet com as garras assimétricas, para contemplar maior número de dimensões de arcos costais. A necessidade de mudar o desenho da Figura 27 ocorreu devido ao grampo tipo Judet aproveitar as propriedades de superelasticidade e memória de forma. O grampo se moldará ao redor da fratura somente pelo calor do corpo enquanto que o grampo de Judet com as garras simétricas e fabricadas em aço inoxidável necessita de instrumentos para inclusão e dobramento sobre a fratura conforme mostrado na Figura 10.



Figura 27: Grampo idealizado por Judet.

Após relato dos cirurgiões torácicos, o grampo foi redesenhado para atender a memória de forma e não interferir no hiato entre as bordas da fratura. O grampo tipo Judet opcional com corpo longo e furos está mostrado na Figura 30 e foi desenhado para evitar que as garras pressionem o hiato entre as bordas da fratura e os furos para facilitarem a osteoindução.

O grampo foi desenhado com comprimento de 53,0 mm, podendo ser ampliado para quaisquer dimensões de arcos costais. Na Figura 28 é mostrado o grampo tipo Judet.

O desenho com dimensões em milímetros do grampo tipo Judet em NiTi é mostrado na Figura 29. (Patente de Invento n°. 1003420-0).

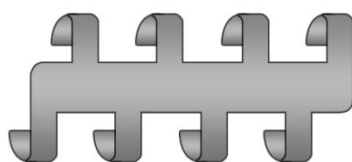


Figura 28: Grampo tipo Judet mostrando as garras assimétricas.

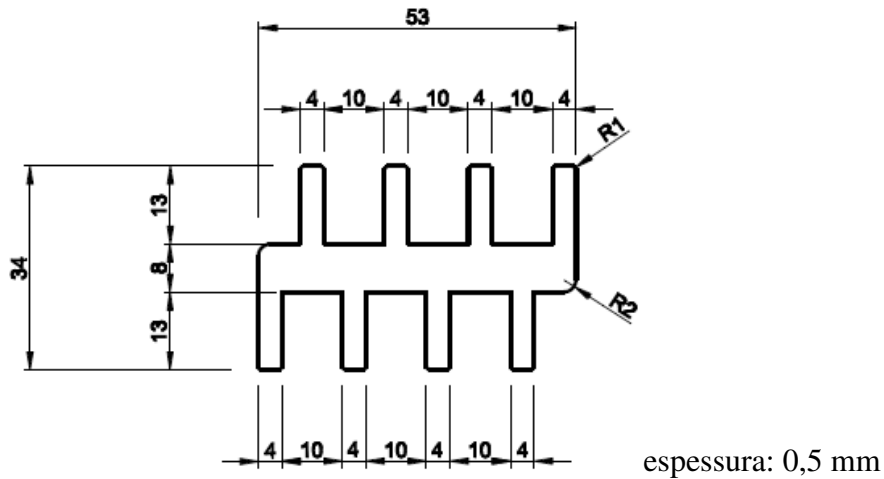


Figura 29: Desenho do grampo tipo Judet, dimensões em mm.

O grampo tipo Judet Opcional com furos para ósteo-indução e centro do corpo longo para não pressionar a folga (hiato) entre as bordas da fratura é mostrado na Figura 30. Na Figura 31 é mostrado o grampo tipo Judet opcional com dimensões em milímetros.

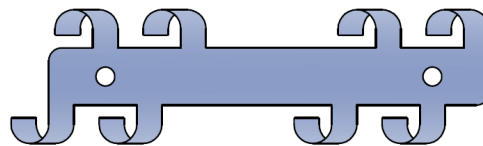


Figura 30: Grampo tipo Judet opcional com corpo longo e furos.

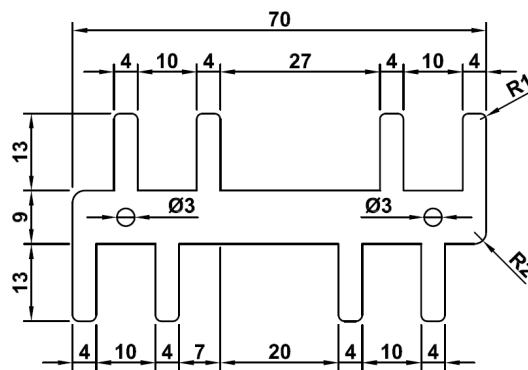


Figura 31: Desenho do grampo tipo Judet opcional.

5.2 Tratamento Superficial

As temperaturas de transformação de fases da liga de Nitinol empregada nesse trabalho foram determinadas por análise de DSC. A partir da análise de DSC (Figura 32), um termograma foi obtido com temperaturas transformação de fases com os resultados $A_f = 52,31^\circ\text{C}$, $A_s = -33,50^\circ\text{C}$, $M_s = 21,71^\circ\text{C}$ e $M_f = -45,50^\circ\text{C}$.

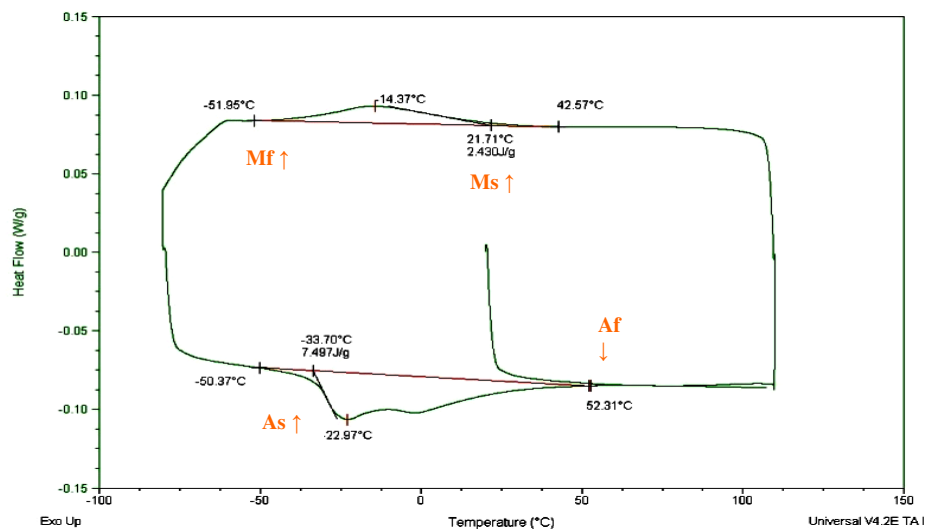


Figura 32: Análise DSC da amostra como-recebida.

O controle de qualidade de recebimento do Nitinol obtido é realizado através do DSC, no qual são verificadas as temperaturas transformação de fases. O material recebido teve resultados diferentes das solicitações feitas ao fabricante que seria a liga BT (*body temperature*). Sendo necessário iniciar a pesquisa com gases refrigerantes tetrafluoretano ou nitrogênio líquido para obtenção da microestrutura martensítica final, Mf (solicitado 5°C, recebido -45,50°C) . Também a temperatura Af, estava fora do especificado (solicitado 35°C, recebido 52,31°C).

Os grampos e tiras foram cortados por eletro erosão a fio (EDM), conforme mostra a Figura 33.

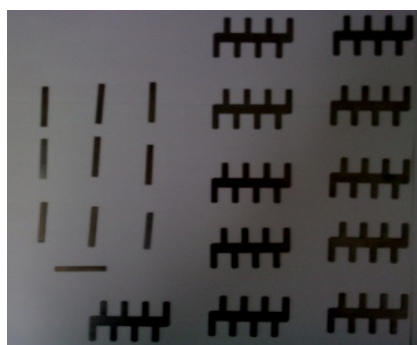


Figura 33: Grampos e tiras cortados em máquina EDM – eletro-erosão a fio.

5.3 Tratamentos Superficiais obtido por Tratamento Térmico

As amostras foram tratadas termicamente com dois diferentes parâmetros, o que resultou na formação de óxidos com aspecto visual distinto em função do tratamento empregado.

As amostras tratadas a 530°C, por 6 min apresentaram oxidação dourada e as amostras tratadas a 570°C por 20 minutos apresentaram oxidação azul. A diferença de coloração está associada à morfologia e a espessura do óxido.

5.4 Tratamento Superficial de Anodização

As amostras submetidas a tratamento eletroquímico de anodização foram anodizadas por 10 minutos e 30 minutos e respectivamente identificadas como AN10 e AN30. As amostras foram lixadas até a lixa 2000 antes do processo de anodização.

As amostras utilizadas no estudo: anodizadas, tratamento térmico com oxidação azul, tratamento térmico com oxidação dourada e a amostra “como recebida”, ou seja, sem nenhum tipo de tratamento posterior a sua aquisição são mostradas na Tabela 12.

Tabela 12: Amostras tratadas e como recebida.

Amostra	Tipo de Tratamento	Observações
AN10	Tratamento eletroquímico	Lixada com lixa Carbetto de silício até lixa 2000 e anodizada 10 min a 25°C
AN30	Tratamento eletroquímico	Lixada com lixa Carbetto de silício até lixa 2000 e anodizada 30 min a 25°C
Oxidação Azul	Tratamento Térmico	Tratamento térmico à temperatura de 570°C
Oxidação Dourada	Tratamento Térmico	Tratamento térmico a temperatura de 530°C
Como Recebida	Sem tratamento superficial	Conforme recebida do fabricante

5.5 Composição química superficial das amostras tratadas

5.5.1 Espectroscopia de retroespalhamento de Rutherford (Rutherford Backscattering Spectroscopy -RBS)

A Figura 34 mostra o perfil da composição obtida por RBS para a amostra como-recebida. É possível observar um patamar relacionado à presença do titânio e outro patamar relativo à presença de níquel na superfície da liga NiTi. Esse resultado já era esperado, considerando-se, que a amostra como recebida não passou por nenhum tratamento superficial específico que pudesse eliminar o níquel da superfície.

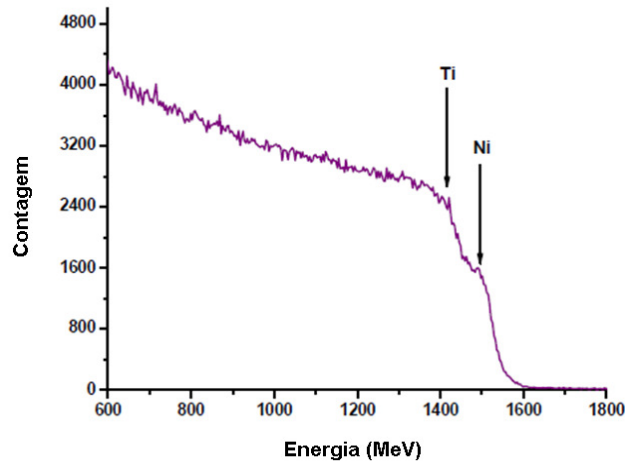


Figura 34: Análise de RBS para a amostra como-recebida.

De acordo com a literatura [127], quando a superfície do Nitinol está anodizada, o óxido de titânio cresce, preferencialmente, em relação aos componentes de níquel. Espera-se, portanto, que a camada de superfície, assim formada, seja rica em titânio e pobre em níquel. De fato, como pode ser visto na Figura 35(a), o patamar correspondente a presença de Ni não é mais observado para a amostra AN10. LEVINTANT-ZAYONTS et al. 2009 [128] analisaram amostras de matérias-primas de Nitinol usando a técnica RBS em comparação com outras técnicas para determinar a composição química da superfície e notaram a redução do nível de níquel na superfície após tratamento com plasma. O processo de anodização empregado no presente trabalho mostrou-se eficiente no empobrecimento do níquel na superfície do Nitinol. Entretanto com o aumento do tempo de anodização de 10 para 30 minutos o níquel reaparece na superfície da amostra como mostrado na Figura 35(b). Esses resultados evidenciam que o tempo de anodização é um parâmetro que influencia fortemente a presença de níquel na camada anodizada formada, indicando que tempos prolongados podem colaborar para a difusão do níquel atrás da possível camada de óxido de Ti formada.

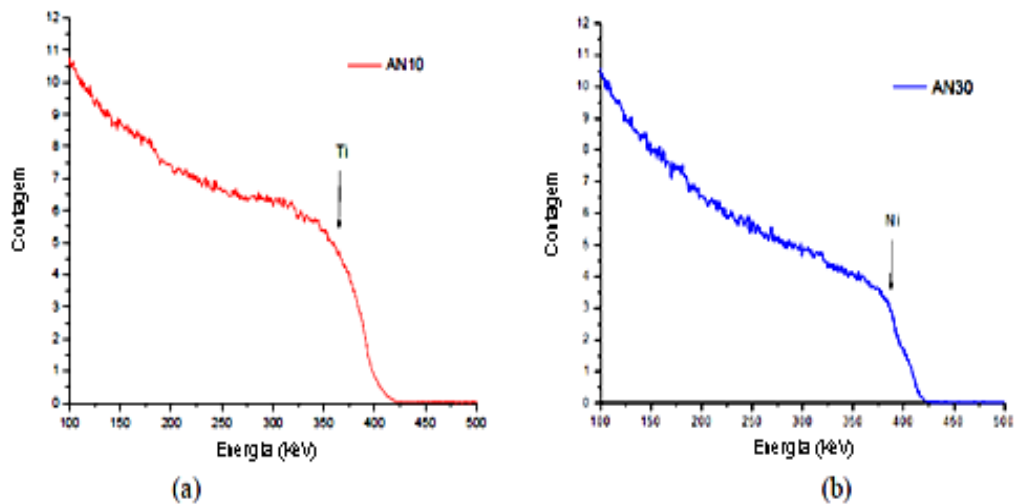


Figura 35: Gráfico de RBS para as amostras. (a) AN10; (b) AN30.

Na Figura 36 estão apresentados os resultados das análises RBS para as amostras com tratamento térmico denominado oxidação azul e oxidação dourada. É possível observar a ausência do patamar associado à presença de níquel, para a amostra de oxidação azul, indicando que durante o processo de anodização ocorre possivelmente a formação de óxido de titânio. Contudo, é possível observar a presença do patamar associado à presença do níquel para a amostra oxidação dourada. Considerando que os óxidos formados nas duas condições tenham a mesma composição, a presença de níquel na amostra de oxidação dourada pode estar associada a uma menor espessura de camada comparativamente a amostra de oxidação azul.

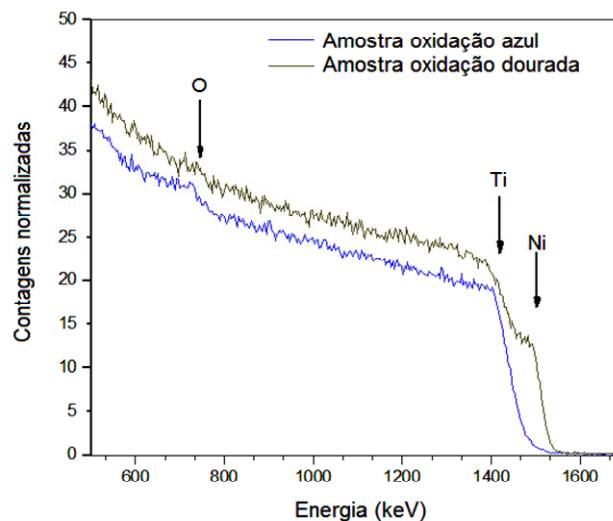


Figura 36: Resultados RBS amostras tratadas termicamente (amostras oxidação dourada e azul).

5.5.2 Difração de Raio-X (X-Ray Diffraction-XRD)

Para avaliar a composição dos óxidos encontrados nas superfícies das amostras como-recebida, anodizada, oxidação dourada e azul foram realizadas análises por difração de Raio-X.

A análise por difração de Raio-X permite identificar a fase de óxido observado nas superfícies. Na Figura 37 um difratograma é mostrado para os sistemas: amostra como-recebida (referência), amostras tratadas termicamente, oxidação azul, 570°C, 20 min, e amostra oxidação dourada, 530 °C, 6 min.

O difratograma obtido para amostra como-recebida (Figura 37) mostra a presença de um pico para $2\theta = 43^\circ$, o qual foi associado ao substrato de NiTi (03-065-7711). Esse pico foi observado também por outros autores [129, 130, 131, 132, 133, 134]. Também é possível observar para essa amostra um pico menos intenso para $2\theta = 16^\circ$, sendo esse pico associado ao óxido de titânio TiO_2 (00-049-1433). Pode-se constatar dessa forma, que o sinal do substrato ainda é detectado, mesmo que a análise tenha sido realizada com ângulo rasante. Isso indica que o óxido formado é de baixa espessura, considerando a intensidade relativa do pico do substrato em relação ao pico do óxido formado. É esperado que exposto à atmosfera natural o Nitinol apresente a formação de uma fina camada de óxido na superfície, contudo, relatos encontrados na literatura têm mostrado que a camada de óxido formada nessas condições é irregular e de baixa espessura, não constituindo, dessa forma, uma barreira efetiva à difusão do níquel [135].

Para a amostra de oxidação azul (Figura 37) foi identificado um pico para $2\theta = 64^\circ$ o qual foi associado ao TiO_2 (01-076-0326). Esse mesmo pico foi observado por outros autores que realizaram com tratamento térmico a 300°C [136]. O pico para $2\theta = 43^\circ$, o qual foi associado ao substrato de NiTi (03-065-7711) também é observado.

Para a amostra com oxidação dourada, foi observado apenas o pico em $2\theta = 43^\circ$, o qual foi associado ao substrato de NiTi (03-065-7711). Como à olho nu é possível observar uma alteração da coloração pela formação de um composto na superfície, esse resultado de difração de raios-X evidencia que o óxido formado apresenta muito baixa espessura, e mesmo para a análise em ângulo rasante apenas o sinal do substrato é detectado.

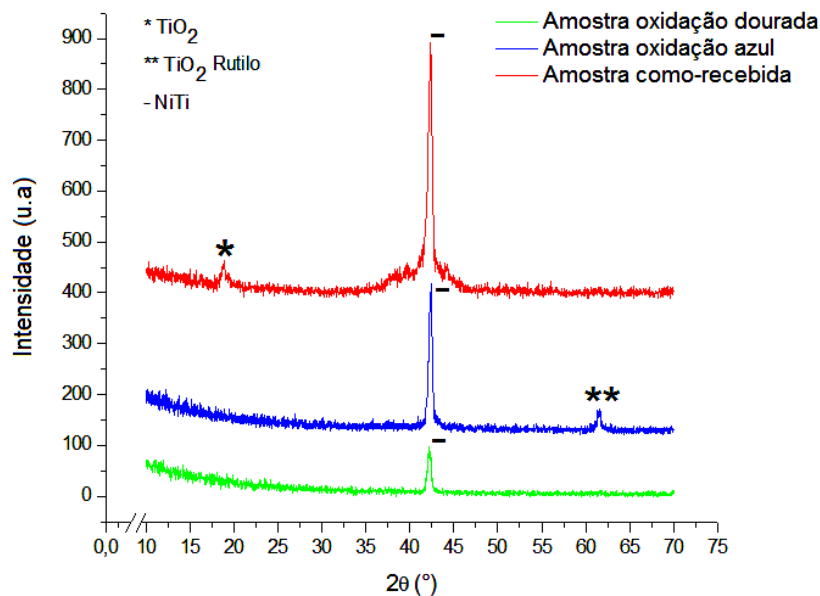


Figura 37: Difração de Raio-X, incidência rasante (5°) sobre as amostras.

Para a amostra anodizada (Figura 38), foram identificados um pico em $2\theta = 40^\circ$, identificado como TiO_2 Rutilo (01-082-0514) e um pico em $2\theta = 43^\circ$, associado ao substrato de Nitinol.

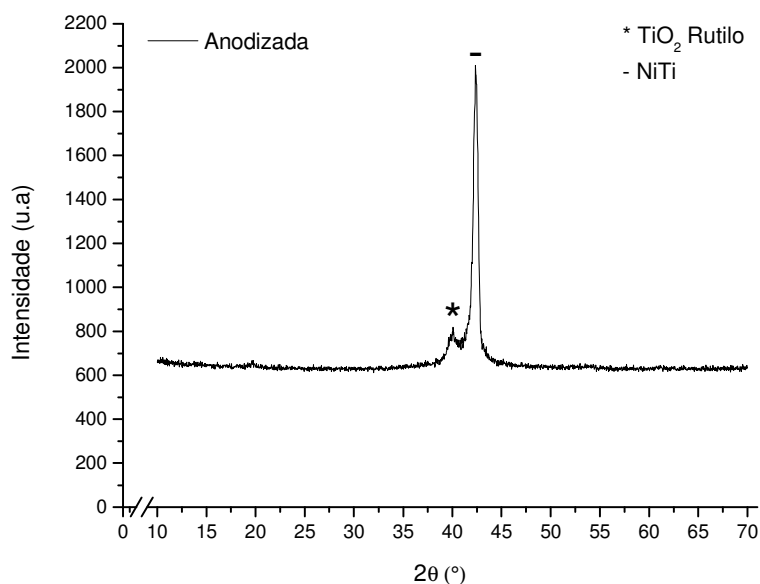


Figura 38: Difração de Raio-X da amostra anodizada, incidência rasante (5°).

5.5.3 Espectroscopia Raman para amostras anodizada, como-recebida, oxidação azul e oxidação dourada.

Com o objetivo de tentar diferenciar os óxidos de titânio formados na superfície, foram realizadas análises por espectroscopia Raman.

Os resultados das análises de espectroscopia Raman para amostras tratadas termicamente são mostrados na Figura 39. Na região de 150 cm^{-1} – 750 cm^{-1} é possível observar a presença de vários picos. Em trabalhos apresentados na literatura, outros autores identificaram a presença de picos na mesma região, quando empregaram tratamento térmico a 530°C com exposição de 1 hora e à 560°C , 1 hora [137].

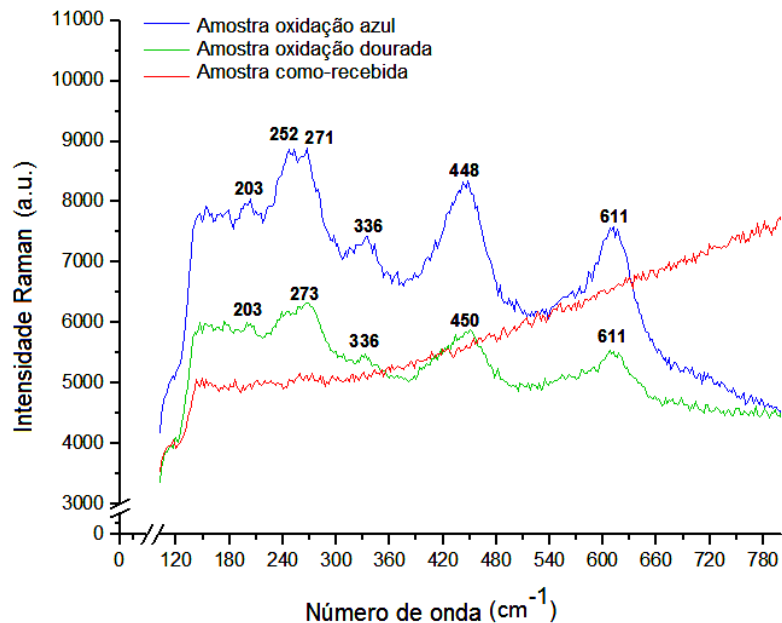


Figura 39: Espectroscopia Raman para as amostras azul, dourada e como-recebida.

Para a amostra anodizada (Figura 40) foi identificado um pico na região de 147 cm^{-1} .

Conforme a Figura 40 observa-se a presença de um espectro de Raman até 2900 cm^{-1} , porém sabe-se que óxidos de Ti normalmente aparecem na região de até 800 cm^{-1} , conforme mostrado por outros autores [131, 132, 133, 137, 138], por isso o interesse em analisar os sinais na região do menor espectro.

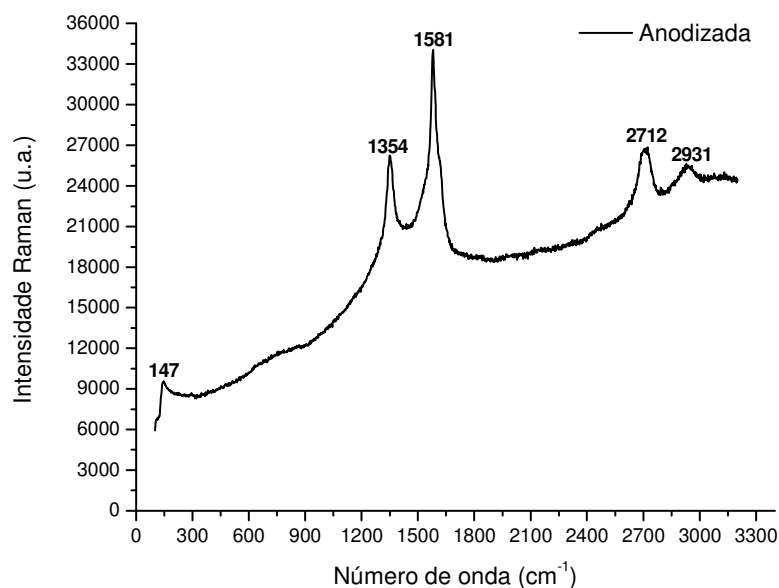


Figura 40: Espectroscopia Raman para amostra anodizada.

Alguns autores [131, 132, 133, 137, 138] associaram os picos que apareceram na região de 230 cm^{-1} a 613 cm^{-1} ao TiO_2 rutilo. No entanto, outros autores [137] identificaram os picos encontrados na região de 143 cm^{-1} – 640 cm^{-1} com TiO_2 anatásio. Portanto, essa técnica não permite diferenciar os óxidos de titânio que se formam, ainda que indique, confirmando os resultados das análises de difração de raios-X (Figura 37 e Figura 38), que os óxidos formados são óxidos de Ti.

5.5.4 Conclusão parcial

Os resultados obtidos quanto a composição química indicaram que para as amostras anodizadas e oxidação azul, houve um crescimento de óxido de titânio e eliminação do sinal do níquel na superfície.

Contudo, mesmo que superficial a análise de RBS pode ter detectado também o sinal do níquel do substrato no caso de óxido de menor espessura, o que pode ter ocorrido no caso da amostra oxidação dourada.

O aumento do tempo de anodização para 30 minutos ocasionou o reaparecimento de níquel na superfície, indicando que o tempo de anodização não contribui apenas para o crescimento da camada de óxido de titânio, mas favorece também a difusão do níquel através da camada de óxido formada.

Os resultados obtidos por Raman e Difração de Raios-X mesmo associados não foram suficientes para diferenciar os óxidos de titânio formados a partir dos tratamentos superficiais.

5.6 Morfologia das amostras tratadas

5.6.1 Avaliação da rugosidade em escala micrométrica por perfilometria de contato

Na Tabela 13 é mostrado que o processo de anodização promove a diminuição da rugosidade de superfície, comparativamente a amostra como recebida ou mesmo às amostras tratadas termicamente. No entanto, a rugosidade aumenta com o aumento do tempo de anodização [131]. Ainda na Tabela 13 é possível observar que as amostras de oxidação dourada e oxidação azul apresentaram maior valor de rugosidade comparativamente aos demais sistemas analisados.

De acordo com os resultados apresentados na literatura, a diminuição da rugosidade micrométrica permite o aumento da adesão das células. Ademais, quanto mais homogênea a rugosidade obtida em Rms, maior o crescimento e a viabilidade celular [139, 140].

Os resultados obtidos nesse trabalho indicaram que o processo de preparação eletroquímica (anodização) promoveu uma significativa redução na rugosidade micrométrica. Estudos anteriores já mostraram que células osteoblastos espalharam mais nas superfícies com baixa amplitude de rugosidade [102] e também que as células de maneira geral aderem menos a superfícies muito irregulares devido a sua inabilidade de estabelecer área de contato suficiente com o substrato [99].

Estudos [139] sobre a influencia da rugosidade e as características químicas na biocompatibilidade do Nitinol para o crescimento de osteoblastos, relataram que poucas modificações foram encontradas no desempenho da viabilidade celular em superfícies com rugosidade Ra que variaram entre $0,15 \pm 0,07 \mu\text{m}$.

Tabela 13: Medidas de rugosidade por perfilometria de contato.

Amostra	Rugosidade		
	R _a (μm)	R _z (μm)	R _{ms} (μm)
Oxidação Azul	0,40 ± 0,07	4,51 ± 0,21	0,52 ± 0,07
Oxidação Dourada	0,50 ± 0,19	5,58 ± 2,82	0,67 ± 0,28
Como-recebida	0,39 ± 0,10	2,68 ± 0,31	0,43 ± 0,01
AN10	0,16±0,05	1,13 ± 0,24	0,20 ± 0,06
AN30	0,25 ± 0,03	2,32 ± 0,34	0,34 ± 0,04

As Figura 41 e Figura 42 mostram as imagens obtidas por perfilometria de contato das amostras analisadas. É possível observar que as amostras denominadas oxidação azul e oxidação dourada, apresentam maior heterogeneidade com relação à rugosidade superficial, isso também pode ser observado para o maior desvio padrão que apresentam os valores de rugosidade para essas amostras (Tabela 13), indicando que a camada de óxido obtida por processo térmico apresenta um crescimento mais desordenado comparativamente ao óxido obtido pelo processo eletroquímico, ou seja, por anodização.

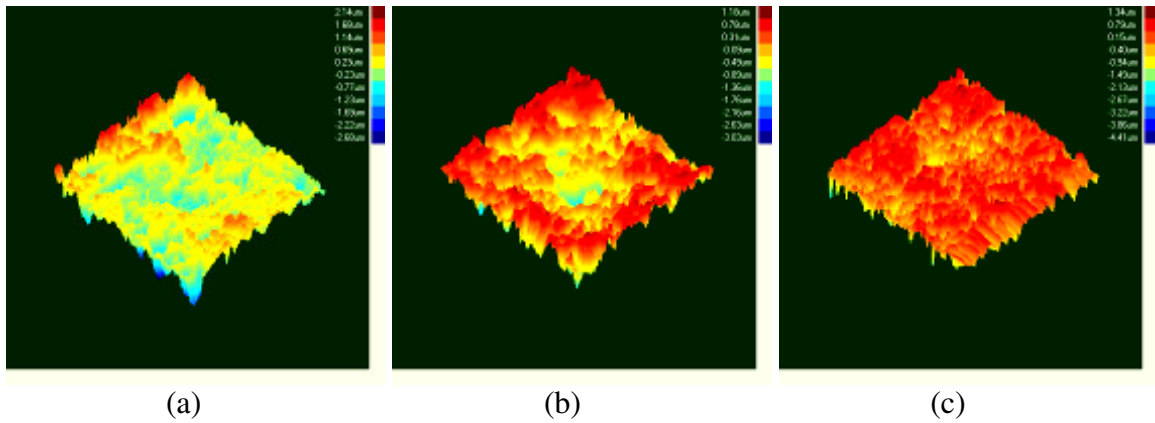


Figura 41: Imagens obtidas por perfilometria de contato. (a) amostra oxidação azul; (b) amostra oxidação dourada; (c) amostra como-recebida.

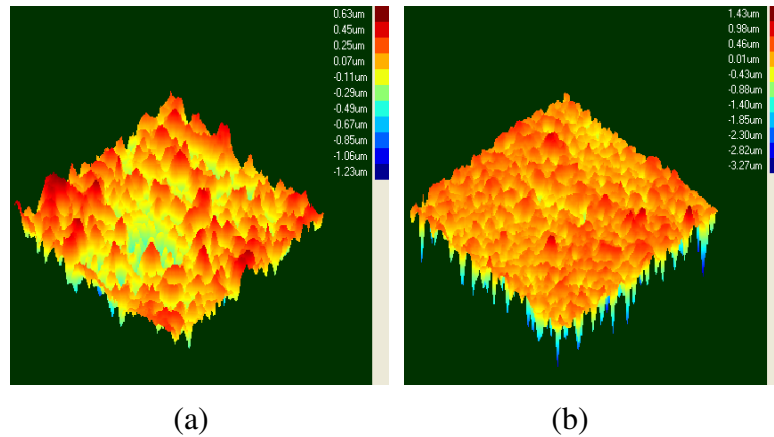


Figura 42: Imagens obtidas por perfilometria de contato. (a) AN10; (b) AN30.

5.6.2 Avaliação da Rugosidade em escala nanométrica por Microscopia de Força Atômica (Atomic Force Microscopy -AFM)

Os maiores valores de rugosidade em escala nanométrica foram observados para a amostra de oxidação azul (Tabela 14), a qual foi submetida a uma maior temperatura de tra-

tamento térmico (570°C) e maior tempo de exposição nesta temperatura (20 min) seguida da amostra anodizada (10 min). As amostras dourada e como recebida apresentaram valores de rugosidade muito semelhantes, indicando que a camada de óxido formada para a amostra de oxidação dourada não altera praticamente a texturização do substrato, em escala nanométrica, comparando com a amostra como recebida. Isso pode estar relacionado com um crescimento pouco pronunciado da camada de óxido ou ainda à morfologia do mesmo. No caso da amostra com oxidação azul, a temperatura mais elevada do tratamento térmico e o maior tempo de exposição, favoreceram a formação de camada de óxido com maior rugosidade nanométrica.

Considerando que irregularidades nanométricas favorecem a adesão celular [139] e que as células de maneira geral aderem-se menos a superfícies muito irregulares em escala micrométrica devido a sua inabilidade de estabelecer área de contato suficiente com o substrato [99]. No presente estudo as amostras com maior rugosidade nanométrica foram a azul e a anodizada AN10. Contudo a anodizada AN10 foi aquela que apresentou menor rugosidade micrométrica indicando que a superfície obtida com essas características é aquela que apresenta condições promissoras para o crescimento e proliferação celular.

Tabela 14: Rugosidade pela técnica AFM.

Amostras	Rugosidades (nm)		
	R_a	R_z	R_{ms}
Amostra oxidação azul	19,4	60,6	23,7
Amostra oxidação dourada	7,0	31,5	9,8
Amostra como-recebida	7,9	34,0	9,9
Anodizada AN10	13,0	53,0	16,0

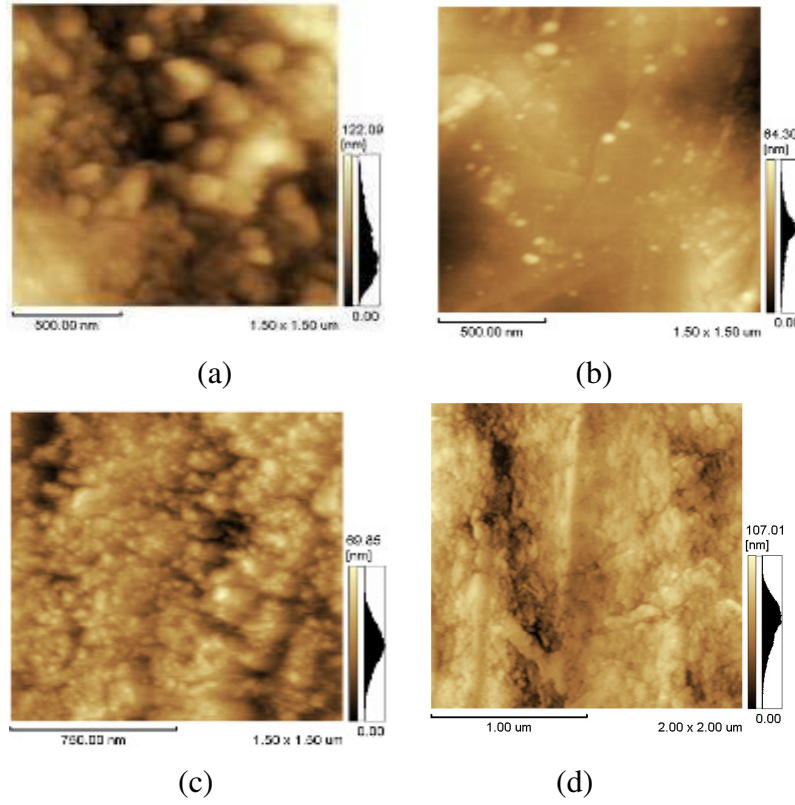


Figura 43: Imagens obtidas por AFM 2D. (a) Amostra oxidação azul; (b) Amostra oxidação dourada; (c) Amostra como-recebida. d) anodizada AN10.

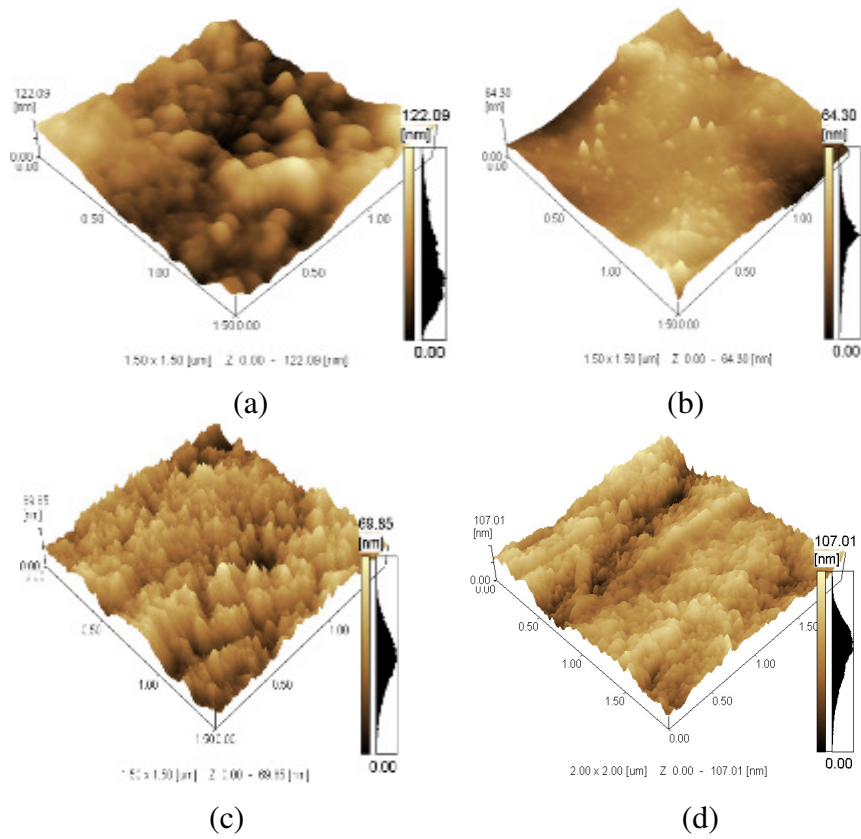


Figura 44: Imagens por AFM 3D. (a) Amostra oxidação azul; (b) Amostra oxidação dourada; (c) Amostra como-recebida. d) anodizada AN10

5.6.3 Molhabilidade

A Tabela 15 apresenta os resultados da molhabilidade nas amostras estudadas, isto é, considerando que as superfícies hidrofílicas têm um ângulo de molhabilidade menor que 90° e que as superfícies hidrofóbicas tem um ângulo de molhabilidade acima de 90° . A amostra como recebida apresentou valor de molhabilidade muito próximo de um valor característico de superfície hidrofóbica. O valor do ângulo de contato para a amostra como-recebida foi similar ao encontrada por [141], em seus estudos sobre molhabilidade de superfícies e sua hemocompatibilidade. Outros estudos [10, 140, 141] mostraram que os tratamentos de superfície tendem a aumentar a hidrofiliicidade. Estes estudos também mostraram que, quanto mais homogênea e refinada a superfície topográfica mais hidrofílica se torna e mais favorável ao crescimento celular. O aumento em hidrofiliicidade foi proporcional ao aumento de rugosidade micrométrica (Tabela 13) para as amostras que receberam tratamento térmico. Os valores observados e mostrados na Tabela 15 são similares aos encontrados na literatura [127].

A amostra AN10 anodizada por 10 minutos, foi a que teve menor ângulo de contato mostrando maior hidrofiliicidade nos estudos das amostras. Em um estudo [105], foi demonstrado que células aderem em maior número sobre superfícies hidrofílicas, avaliando-se o crescimento de osteoblastos sobre superfície de titânio. Uma significativa redução do ângulo de contato, também foi obtida por HUAN et al. 2012 [142], em seus estudos sobre a formação de poros na superfície do Nitinol. Entretanto o aumento do tempo de anodização para 30 minutos (amostra AN30) aumentou o ângulo de contato, alcançando valores próximos do ângulo de contato da amostra como-recebida. Isso pode estar associado ao aumento da rugosidade. É importante notar que houve um aumento de rugosidade na amostra AN30 em comparação a amostra AN10 (Tabela 13) e que da mesma forma observa-se uma aumento do ângulo de contato para a mesma (Tabela 15), indicando que a superfície apresenta-se, comparativamente a AN10, mais hidrofóbica. É importante ressaltar que a molhabilidade não depende apenas da morfologia, mas também da composição química da superfície [127], e como foi mostrado anteriormente o aumento do tempo de anodização fez com que o níquel ressurgisse na superfície (Figura 35).

Tabela 15: Valores do ângulo de contato (solução PBS).

Amostras	Ângulo de contato (°)
AN 10	45,6 ± 8,1
AN 30	87,3 ± 11,4
Oxidação azul	78,0 ± 10,0
Oxidação dourada	60,0 ± 5,0
Como-recebida	86,0 ± 8,0

5.6.4 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias obtidas por MEV (Figura 45) mostram a superfície da amostra como-recebida onde se podem observar cavidades irregulares provavelmente devido ao processo de fabricação. Esta morfologia de Nitinol não tratado tem sido reportada na literatura por diversos autores [143, 144, 145]. Estas investigações também observaram a presença de uma camada de óxido com espessura entre 3 e 10 nm, que se formava espontaneamente sobre o material quando exposto ao ambiente. Sendo relatado na literatura que essa camada é composta de três diferentes óxidos. Na camada interna, adjacente ao substrato, eles encontraram a presença de TiO; na camada intermediária, eles encontraram a presença de Ti₂O₃; e por último na camada mais externa eles encontraram a presença de TiO₂. A presença de níquel, nas três camadas, seria perfeitamente aceitável, por que sua reação com o oxigênio poderia levar à formação de óxido de níquel, no entanto, a formação preferencial do óxido de titânio está possivelmente relacionada à maior taxa de crescimento do óxido de titânio.

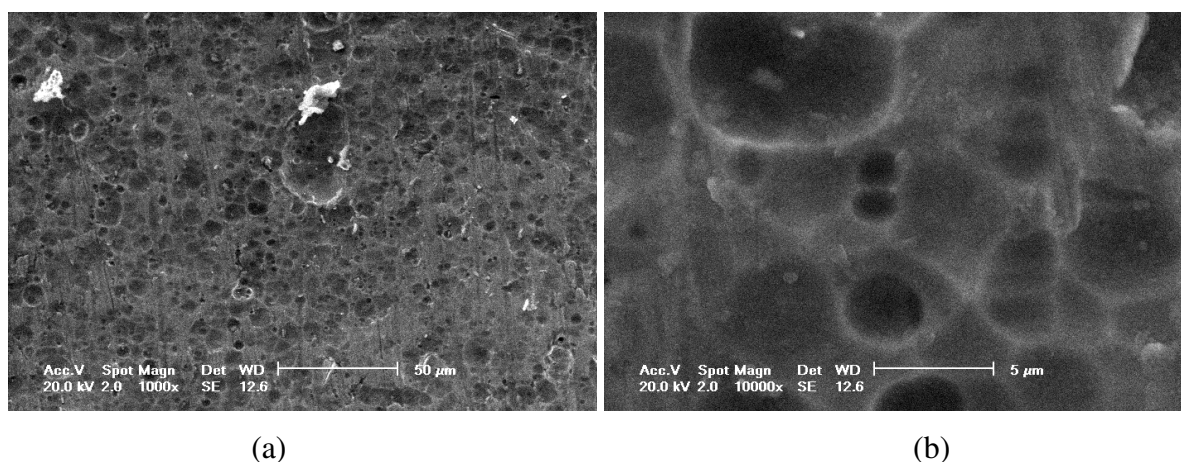


Figura 45: Micrografia obtida por MEV para amostra de NiTi como-recebida. (a) baixa ampliação 1000x; (b) alta ampliação 10.000x.

As cavidades largas e irregulares observadas para a superfície das amostras como recebidas (Figura 45) foram substituídas por uma superfície mais regular quando as amostras são submetidas aos tratamentos superficiais. Após o processo de anodização a superfície aparenta ficar mais refinada e homogênea como mostrado nas micrografias nas Figura 46 e Figura 47. O refinamento da morfologia da superfície após anodização já era esperado. Vários estudos [5, 12, 131] reportaram à suavização das irregularidades e à formação de camada de óxido no Nitinol anodizado. YANG et al. 2006 [146], comprovaram em seu estudo anodização de arcos ortodônticos em ligas de NiTi que o tipo de eletrólito não altera a morfologia da camada formada após testes com ácidos sulfúrico, fosfórico, e com fosfato e sulfato de sódio.

Outro aspecto importante visto na amostra AN10 (Figura 46) é que a superfície da amostra anodizada não apresentou trincas, como apresentaram superfície anodizadas, conforme relatos de outros autores [5]. Estas fissuras permitiriam que o meio entrasse em contato com o metal base, expondo-o a fluídos que poderiam acelerar o processo de corrosão e causar a migração de níquel para o sistema.

Entretanto a amostra AN10 apresentou formação morfológica diferente da amostra AN30. Para a amostra AN30 a camada de óxido é uniforme e compacta, no entanto, é possível observar a formação de partículas que rompem a superfície do óxido (Figura 47). Estas partículas são aparentemente compostas de níquel e titânio, como o substrato, como revelado na análise EDS (Figura 48) e evidenciam o reaparecimento do níquel na superfície da amostra anodizada com o aumento do tempo de anodização. Esses resultados confirmam os resultados obtidos por RBS, que mostravam o reaparecimento do patamar do níquel para a amostra anodizada por 30 minutos (Figura 35b).

CHU et al. 2008 [147] observaram a formação de partículas com morfologia similar à morfologia observada para a amostras anodizadas por 30 minutos e estas partículas foram identificadas por análise de difração de Raio-X, como sendo composta de Ti_2Ni .

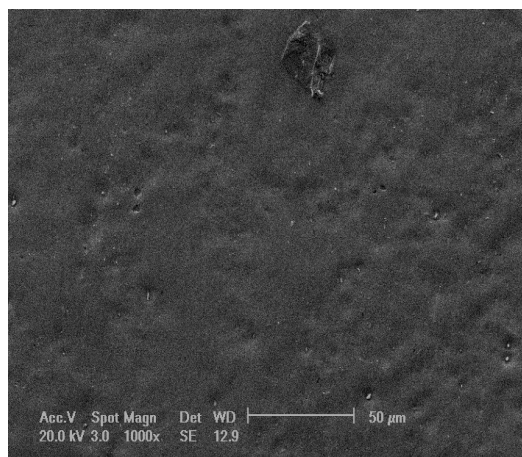


Figura 46: Micrografia da amostra AN10.

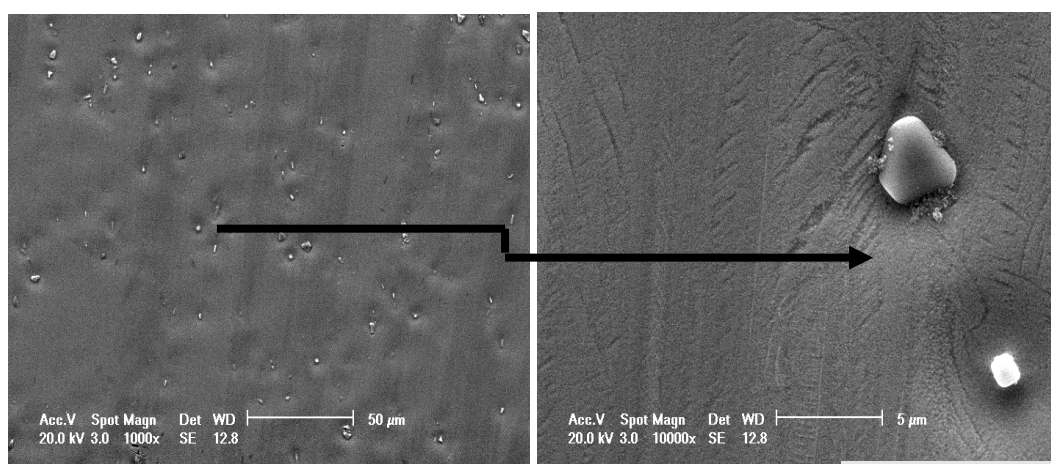


Figura 47: Micrografia da amostra AN30.

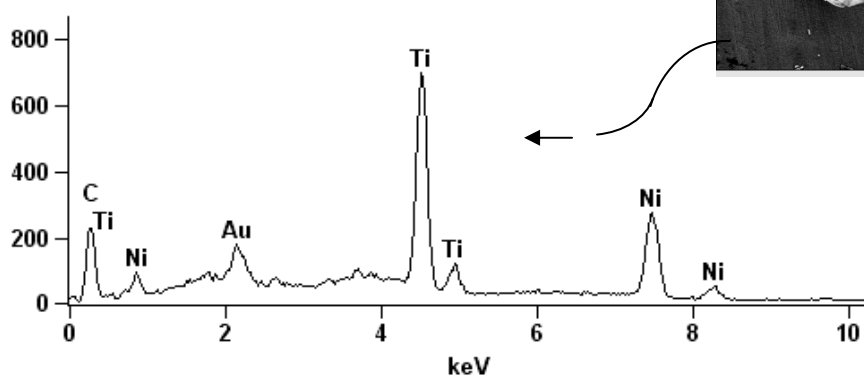


Figura 48: Espectro de EDS da partícula que rompe a camada de óxido na amostra AN30.

Na Figura 49 observa-se a morfologia das superfícies das amostras após tratamento térmico e a Figura 50 apresenta as imagens das seções transversais das amostras estudadas.

Comparativamente às amostras anodizadas (Figura 46 e Figura 47) é possível perceber que as amostras tratadas termicamente preservam a morfologia da superfície da amostra como

recebida (Figura 45), ou seja, não é observado um refinamento da morfologia, mas ao contrário disso observa-se a presença de cavidades irregulares, provavelmente oriundas do processo de fabricação.

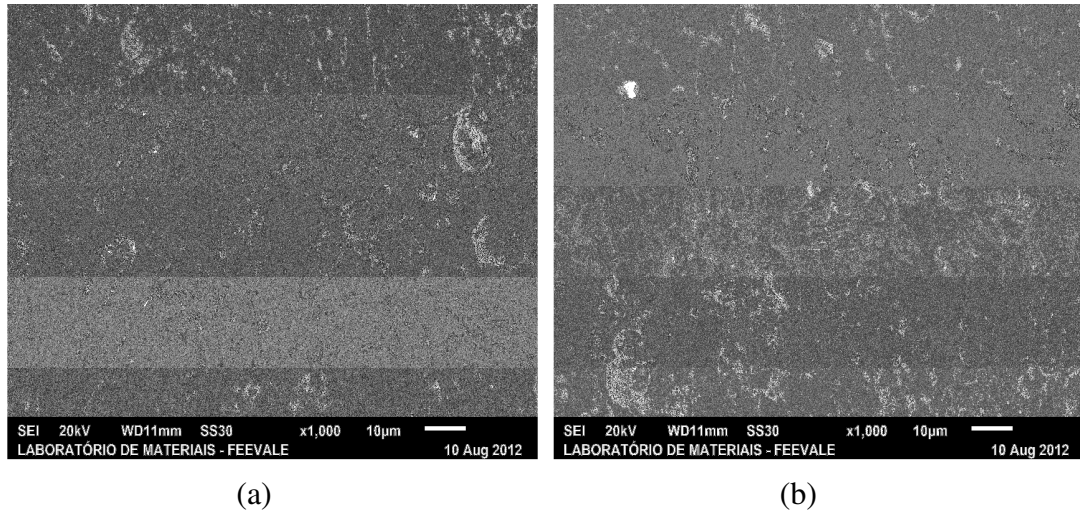
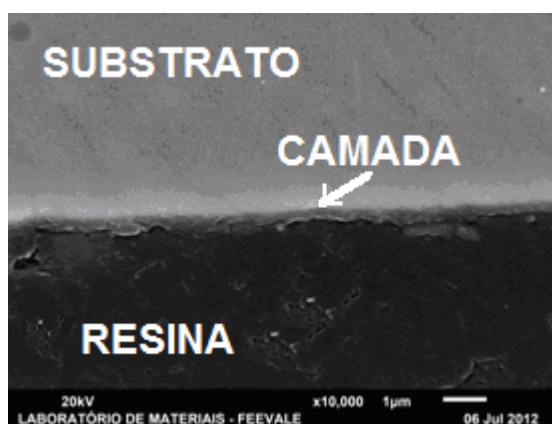


Figura 49: Morfologia da superfície das amostras: (a) tratamento superficial oxidação dourada (tratamento térmico a 530°C por 6 min). (b) tratamento superficial oxidação azul (tratamento térmico a 570°C por 20 min).

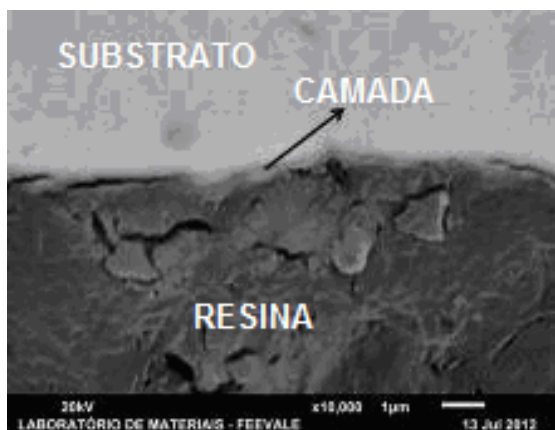
A partir da Figura 50 e Tabela 16 é possível observar os valores das espessuras das camadas dos óxidos obtidos após tratamento superficial. A amostra de oxidação azul apresentou a maior espessura de camada ($0,42 \pm 0,21 \mu\text{m}$), seguida pela amostra de oxidação dourada ($0,35 \pm 0,09 \mu\text{m}$) e pela amostra anodizada ($0,30 \mu\text{m} \pm 0,08$). Como se pode observar pelo valor do desvio padrão da espessura de camada, a amostra oxidação azul apresentou uma espessura de óxido irregular, comparativamente à amostra de oxidação dourada e à amostra anodizada, as quais apresentaram um baixo valor de desvio padrão para a espessura média determinada. É sabido que o Nitinol deve ter uma espessura de camada de óxido de Ti que seja suficiente para formar uma barreira e prevenir a liberação de níquel para o meio. Por outro lado, como o óxido é frágil esta camada pode não acompanhar a deformação do substrato quando for exigida a memória de forma. Diferentes autores [5, 6, 129, 148, 149, 150] obtiveram, por diferentes métodos, espessuras de camadas de 25-30 nm. VOJTECH et al. 2010 [151], oxidaram amostras a 480 e 530°C, por 10 min. e resfriaram ao ar. Com estas temperaturas eles obtiveram 70 e 140 nm, respectivamente, e encontraram TiO_2 rutilo com baixa concentração de níquel como produto de oxidação. Contudo, empregando, por exemplo, parâmetros muito semelhantes para o tratamento térmico, no presente trabalho as camadas obtidas foram muito mais espessas. Camadas mais espessas podem favorecer o efeito barreira, contudo, dependendo da característica do óxido podem romper durante o trabalho para dar forma ao componente.

Tabela 16: Espessuras de camadas de óxido.

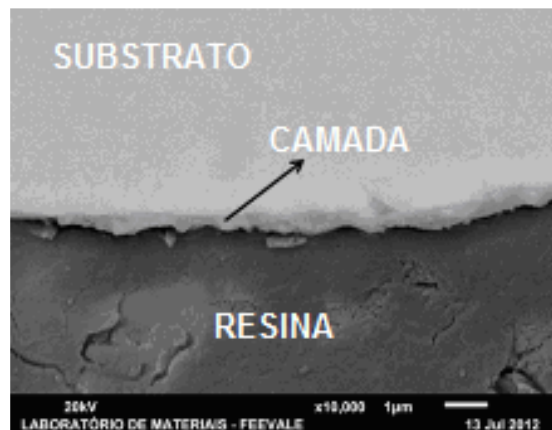
Amostras	Médias (μm)
Anodizada AN10	$0,30 \pm 0,08$
Oxidação dourada	$0,35 \pm 0,09$
Oxidação azul	$0,42 \pm 0,21$



(a)



(b)



(c)

Figura 50: MEV das imagens das seções transversais. (a) amostra anodizada AN10 (b) amostra oxidação azul (c) amostra oxidação dourada.

A amostra oxidação azul, não apresentou qualquer traço de níquel, na análise por RBS enquanto a amostra oxidação dourada aparece pequena contagem de níquel (Figura 36). A técnica RBS ainda que uma técnica superficial pode ter tido influência do substrato. O fato de ter apresentado alguma contagem de níquel em RBS não é conclusivo, pois se vê claramente no corte transversal a formação de uma camada espessa de óxido de titânio na Figura 50(c) e, além disso, por MEV não foi observada a presença de fissuras na Figura 51(b). Apesar de for-

tes indícios indicarem a amostra dourada como o melhor sistema, contudo seria necessário avaliar com uma técnica para determinação da composição química que seguramente não tivesse influência do substrato como, por exemplo, XPS (Espectroscopia de Foto-elétron de Raios- X).

5.6.5 Pulsação Cíclica: Teste de Dobramento

Um dos principais testes de aprovação de revestimentos em Nitinol se baseia no teste de dobramento, pois esse teste revela o comportamento da camada de óxido obtida, indicando se essa camada poderá trincar ou descamar quando o material for solicitado à memória de forma. O caráter cerâmico do óxido com baixa plasticidade constitui-se no grande problema a ser resolvido ao tratarem-se superfícies em Nitinol para implantes. Uma camada de óxido suficientemente espessa para formar barreira ao níquel e suficientemente delgada para atender acompanhar as deformações do substrato são requeridas para esse tipo de aplicação.

Neste estudo como as temperaturas de transformação de fases eram conhecidas, a liga foi submetida a resfriamento com gás refrigerante 404a e/ou nitrogênio líquido para alcançar a temperatura M_f , e, assim, completar a transformação martensítica. Após resfriadas, severa deformação foi realizada nas amostras oxidação azul, oxidação dourada e anodizada de dimensões 4 mm x 34 mm x 0,5 mm com dobramento a 90° e, em temperatura ambiente, as amostras retornaram a forma austenítica que havia antes do dobramento. As superfícies oxidação azul, dourada e anodizada foram analisadas por MEV após o teste da memória de forma para verificar a possibilidade de trincas ou descamação.

Dentre as amostras tratadas, a amostra oxidação azul Figura 51(a) e amostra anodizada 51(c) apresentaram trincas enquanto a amostra oxidação dourada Figura 51(b) não apresentou trincas ou descamações. Alguns autores [150] observaram a presença de trincas para óxidos com espessura na ordem de 100 nm, (em Undisz não havia relato de velocidade de resfriamento para comparar), esses resultados indicam que não somente as espessuras estão diretamente relacionadas com formação de trincas no dobramento, mas provavelmente a uniformidade de espessura de camada e as características do óxido formado. Da mesma forma, outros autores, tais como Shabalowskaya [20] realizaram tratamento térmico a 540°C por 2 minutos e obtiveram espessura de óxido com 30 nm, que quando testado com 8% de deformação apresentaram trincas na superfície.

O resultado obtido para a amostra oxidação dourada é similar ao encontrado na literatura por VOJTECH et al. 2010 [151].

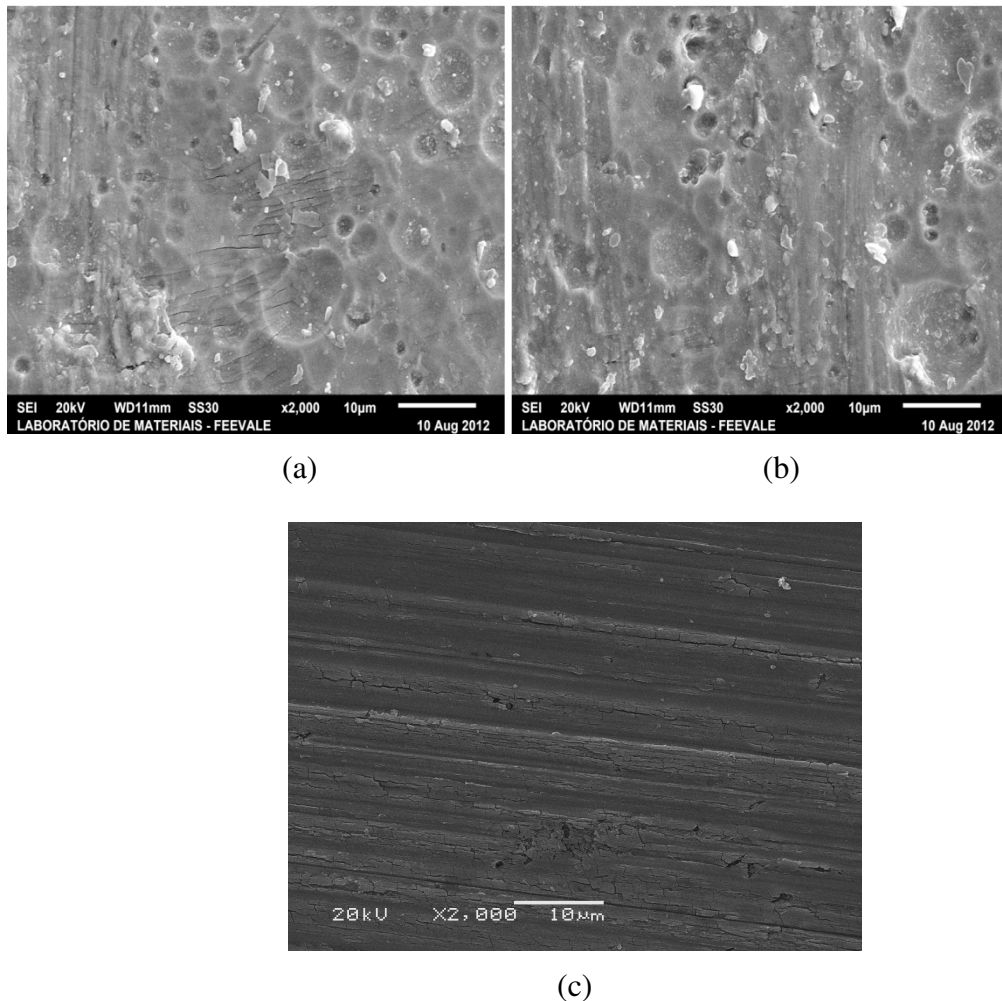


Figura 51: Imagens obtidas por MEV após o teste de pulsação cíclica. (a) amostra oxidação azul; (b) amostra oxidação dourada e (c) amostra anodizada AN10.

5.6.6 Conclusão parcial

As superfícies das amostras anodizadas apresentaram-se homogêneas, porém verificou-se que o aumento do tempo de anodização altera a morfologia e composição da superfície. Para a amostra anodizada por 10 minutos obteve-se um óxido empobrecido em níquel enquanto para o tempo de 30 minutos foi possível observar o reaparecimento do níquel na superfície.

O processo térmico de oxidação promoveu a formação de uma camada de óxido com rugosidade micrométrica mais heterogênea, comparativamente à amostra anodizada. Contudo, as amostras anodizadas, apresentaram o menor valor rugosidade micrométrica, determinada

por perfilometria de contato, e maior rugosidade nanométrica, comparativamente às amostras denominadas oxidação azul e oxidação dourada.

Considerando que irregularidades nanométricas favorecem a adesão celular e que as células de maneira geral aderem-se menos a superfícies com elevada rugosidade micrométrica, a amostra anodizada, ou seja, a obtenção da camada de óxido pelo processo eletroquímico é a superfície que apresenta condições promissoras para o crescimento e proliferação celular.

A amostra de oxidação azul apresentou a maior espessura de camada ($0,42 \pm 0,21 \mu\text{m}$), seguida pela amostra de oxidação dourada ($0,35 \pm 0,09 \mu\text{m}$) e pela amostra anodizada ($0,30 \mu\text{m} \pm 0,08$). Como se pode observar pelo valor do desvio padrão da espessura de camada, a amostra oxidação azul apresentou uma espessura de óxido irregular, comparativamente à amostra de oxidação dourada e à amostra anodizada. O que indica que ainda que com maior espessura de camada, esses óxidos formados podem ter em determinadas regiões espessuras muito menores que os óxidos formados nos demais sistemas estudados. Camadas mais espessas podem favorecer o efeito barreira, contudo, dependendo da característica do óxido podem romper durante o trabalho para dar forma ao componente.

Após teste de pulsação cíclica, dentre as amostras tratadas termicamente, amostra oxidação azul e a amostra anodizada apresentaram trincas enquanto a amostra de oxidação dourada não apresentou trincas ou descamações.

A amostra AN10 anodizada por 10 minutos, foi a que teve menor ângulo de contato, ou seja, maior hidrofiliabilidade comparativamente aos demais sistemas estudados.

Estudos apresentados na literatura mostraram que os tratamentos de superfície tendem a aumentar a hidrofiliabilidade. Estes estudos também mostraram que, superfícies mais hidrofílicas favorecem crescimento celular.

5.7 Culturas de Células

5.7.1 Cultura celular

Como para as amostras anodizadas por 30 minutos foi observado o reaparecimento do níquel na superfície, apenas as amostras anodizadas por 10 minutos foram encaminhadas para teste de cultura de célula e toxicidade.

A Figura 53 mostra imagens de MEV sobre superfícies de NiTi, após cultura de células. Para qualquer que seja a rugosidade nenhuma orientação particular das células foi observado para todas as amostras e as células apoptóticas de formato esférico (Figura 52a) e células saudáveis de formato alongado (Figura 52b).

Nas Figura 53a, Figura 53b, Figura 53c e Figura 53d é possível observar que todos os sistemas estudados apresentaram células em apoptose. Apoptose do grego *anoikis*, “homeless”, indica possível falta de adesão ao substrato, que significa uma morte pré-programada da célula. Contudo as células que estão em apoptose podem ser apenas células que não conseguiram aderir para crescer e proliferar, mas não caracterizam toxicidade do sistema. Em vários pontos de todas as amostras, foi possível observar células apoptóticas ou células entrando em apoptose. Nas Figura 52a e Figura 52b, é possível diferenciar células apoptóticas e saudáveis. Aparentemente, as amostras anodizada (AN10) e oxidação dourada apresentaram maior espriamento celular.

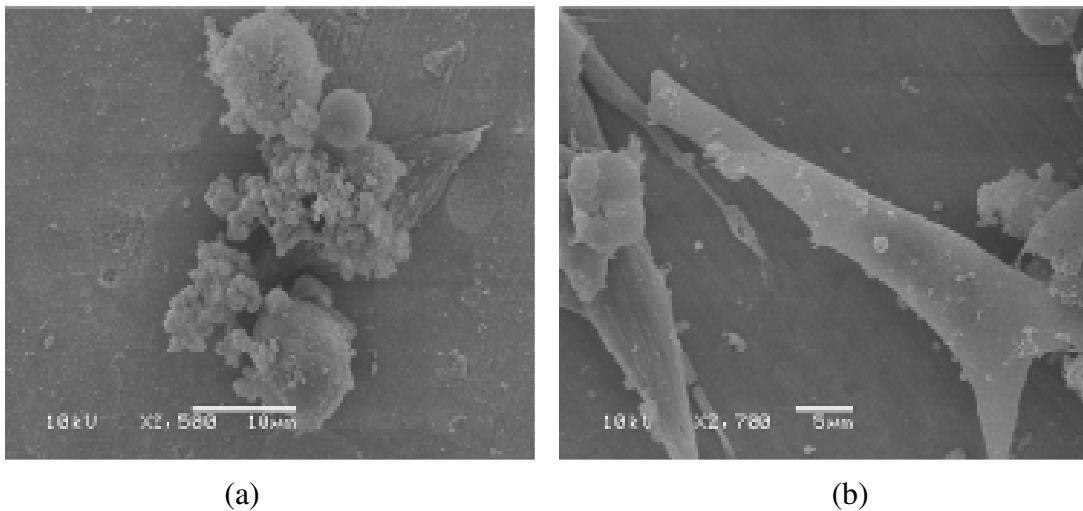
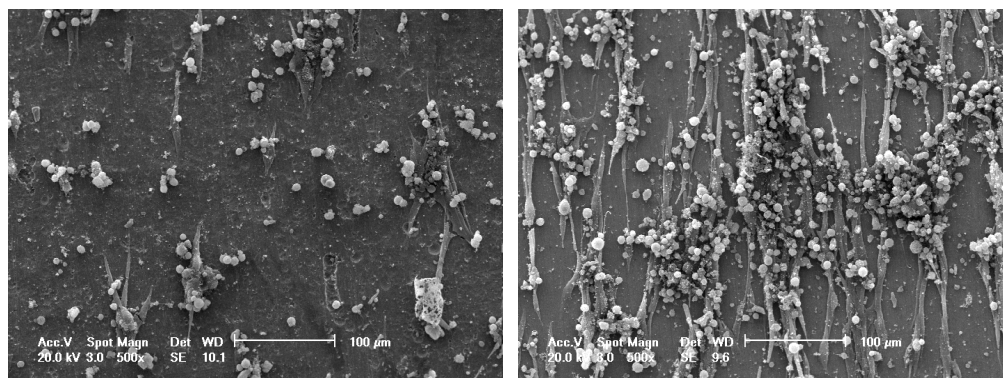
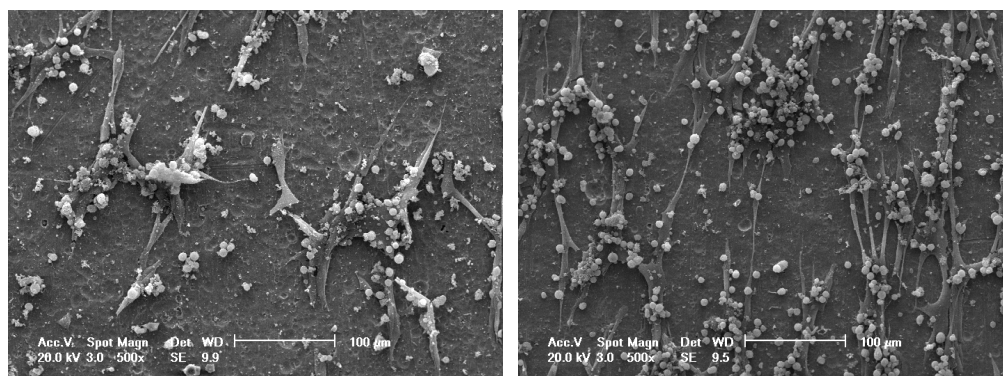


Figura 52: Imagens em MEV após cultura de células. (a) típica célula apoptótica (b) célula saudável.



Como recebida (a)

Anodizada AN10 (b)



Azul (c)

Dourada (d)

Figura 53: Imagens em MEV após cultura de células. (a) como-recebida; (b) anodizada AN10; (c) oxidação azul; (d) oxidação dourada.

5.7.2 Viabilidade Celular

O ensaio de toxicidade MTT revelou, de acordo com a Figura 54, as superfícies de maior viabilidade de crescimento celular. De acordo com esse ensaio a amostra oxidação azul com 80% de viabilidade; apresentou maior viabilidade, seguida pela amostra oxidação dourada, com 75% de viabilidade, e a superfície anodizada com 60% de viabilidade. De qualquer forma, todos os tratamentos promoveram o aumento da viabilidade comparativamente à amostra como-recebida, para qual foi observada uma viabilidade de 55%.

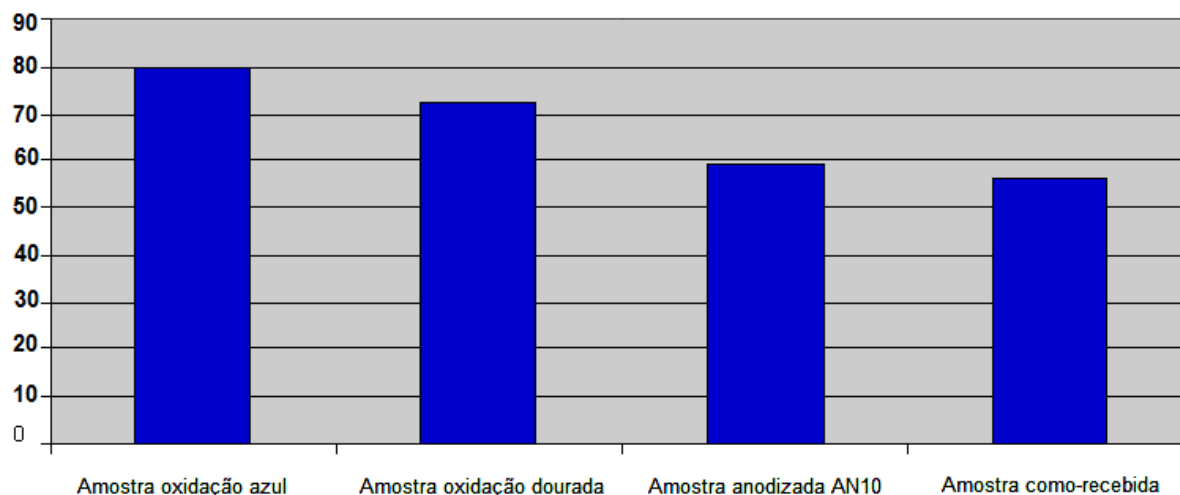


Figura 54: Percentual de viabilidade de crescimento celular.

Muitos pesquisadores testaram “in-vivo” amostras de Nitinol como-recebidas as quais apresentam camada passivada de óxido de titânio entre 3 e 10 nm e não observaram reações adversas por diversas semanas. Contudo, é aceito para biocompatibilidade camadas superficiais de óxido de titânio acima de 10 nm [135].

A rugosidade micrométrica foi maior para as amostras tratadas termicamente (oxidação dourada e oxidação azul) e dentre esses dois sistemas a rugosidade nanométrica foi maior para a oxidação azul.

Células fibroblastos são conhecidas por preferirem superfícies menos rugosas que as células osteoblastos [139]. E quando a rugosidade está acima do tamanho da célula, as células preferem superfícies com rugosidade isotrópica que formam ninhos e favorecem a adesão [105].

Contudo, observando o tamanho das células a partir das micrografias obtidas por MEV (Figura 52) é possível observar que as células apresentavam tamanho muito superior à rugosidade micrométrica da superfície.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento superficial de anodização com eletrólitos livres de fluoretos promoveu o empobrecimento de níquel na superfície das amostras de Nitinol devido à formação de um óxido de titânio.

Além disso, comparativamente aos demais sistemas estudados, as amostras anodizadas apresentaram-se mais hidrofílicas com maior rugosidade nanométrica, menor rugosidade micrométrica e menor espessura de camada. A viabilidade de crescimento celular observadas para essas amostras foi de 60%, indicando que essa superfície apresenta características promissoras para aplicação biomédica. Contudo, foram observadas trincas na superfície após o ensaio do dobramento, o que indica a necessidade de um melhor controle da espessura e da propriedade mecânica da camada anodizada.

Neste estudo verificou-se também que o tempo de anodização é um parâmetro importante para o processo tendo sido observado que aumento o tempo de anodização de 10 minutos para 30 minutos promoveu o ressurgimento do níquel na superfície.

Os óxidos obtidos através de tratamentos térmicos, a 530°C (oxidação dourada) e a 570°C (oxidação azul), promoveram o crescimento de óxido de Ti que atuou como barreira para níquel. A superfície com oxidação azul, apresentou viabilidade de crescimento celular para células fibroblastos de 80%, enquanto as amostras com oxidação dourada apresentaram 75% de viabilidade de crescimento celular. Entretanto, após ensaio de dobramento, a camada azul, que obteve maior espessura, apresentou trincas após o ensaio de dobramento.

Concluiu-se, ainda, que para desenvolvimento do grampo tipo de Judet em Nitinol, estes parâmetros devem ser pré-estabelecidos tais como rugosidade da superfície, hidrofili- cidade, espessura de camada superficial de óxido apropriada aos ensaios cíclicos de dobra- mento para o aproveitamento da propriedade memória de forma seguida de ensaios de viabili- dade de crescimento celular. Os parâmetros estudados no presente trabalho indicam que pro- cessos de tratamentos superficiais permitiriam a utilização do Nitinol como provável alterna- tiva para os grampos de Judet utilizados na osteossíntese costal, uma vez que os tratamentos propostos favoreceram o crescimento de óxido de titânio na superfície.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver crescimento celular nas amostras óxido dourado e AN10, com células osteoblastos.
- Investigar o comportamento apoptótico na superfície do NiTi tratado termicamente.
- Continuar pesquisa com crescimento celular de fibroblastos em amostras de materiais para implantes, tais como aço inoxidável 316 L, Titânio cp, Ti_6Al_4V , cobalto-cromo e tântalo.
- Observar a quantidade de fibroblastos no encapsulamento fibroso “in vivo” do grampo com tratamento térmico oxidação dourada (530°C) e AN10 tendo como controle o encapsulamento do Ti_6Al_4V .
- Testar grampos tipo Judet “in vivo” com células osteoblastos em cobaias.
- Desenvolver estudo de superfície metálica compatível à interface osso trabecular/implante.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] VASCONCELOS, A.C. **Fundamentos da biomedicina**. UFMG, 1999.
- [2] VILLARINHO, D. J. **Caracterização de uma liga NiTi visando confecção e aplicação co-mo material biomédico em órtese Grampo de Judet**. Dissertação de mestrado, UFRGS, 2010.
- [3] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. VILLARINHO, D., VILLARINHO, D. J., SCHAEFFER, L.; NETO, A. V. M. **Grampo Ortopédico em Nitinol Memorizado com Tratamento Termomecânico, Processo de Produção e Método de Utilização**. BR n. PI: 1003420-0, 29 setembro 2010.
- [4] ANVISA, portarias 2043/94 e 686/98. <http://www.anvisa.com>. Visitado em 17.02.2011.
- [5] BAYAT N.; SANJABI S.; BARBER Z.H. **Improvement of corrosion resistance of NiTi sputtered thin films by anodization**. Applied Surface Science, v. 257, p. 8493– 8499, 2011.
- [6] CHRZANOWSKI, W.; ABOUNEEL, E.; ARMITAGE, D.A.; KNOWLES, J.C. **Surface preparation of bioactive NiTi alloys using, alkali, thermal, treatments and spark oxidation**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 19, n. 4, p. 1553-7, 2008.
- [7] GU, Y.W.; TAY, B.Y.; LIM, C.S.; YONG, M.S. **Characterization of bioactive surface oxidation layer on NiTi alloy**. Applied Surface Science, v. 252, n. 5, p. 2038-2049, 2005.
- [8] NA, Y.; WANG, Q.; NAKANO, K.; TOMIDA, M.; KAWAKAMI, T.;ZHANG, Y. **L929 cell adhesion on the surface oxidized NiTi shape memory alloy**. Journal of Hard Tissue Biology, v. 20, n. 1, p. 53-8, 2011.
- [9] SANTOS, J.R. **Mechanical properties of titania films used as biomaterials**. Materials Chemistry and Physics. v. 102, pp. 92-7, 2007.
- [10] CHU, C.L.; CHUNG, C.Y.; ZHOU, J.; PU, Y.P.; LIN, P.H. **Fabrication and characteristics of bioactive sodium titanate/titania graded film on NiTi shape memory alloy**. Journal of Biomedical Materials Research, v. 75, n. 3, p. 595-602, 2005.
- [11] LI; BING-YUN; RONG; LI-JIAN; LI, Yi-Yi; GJUNTER, V.E. **An investigation of the synthesis of Ti-50 at pct Ni alloys through combustion synthesis and conventional powder sintering**. Metallurgical and Materials Transactions, 31A, 1867-71, 2000.
- [12] CHENG, F.T.; SHI, P.; PANG, G.K.H.; WONG, M.H.; MAN, H.C. **Microstructural characterization of oxide film formed on NiTi by anodization in acetic acid**. Journal of Alloys and Compounds, v. 438, p.238-42, 2006.

-
- [13] WEVER, D. J.; VELDHUIZEN, A.G.; DE VRIES, J.; BUSSCHER, H.J., UGES, D.R & VAN HORN, J.R. **Electrochemical and surface characterization of a nickel-titanium alloy.** Biomaterials, v. 19, p.761-769, 1998.
- [14] CISSÉ, O.; SAVADOGO, O.; WU, M.; YAHIA, L.H. **Effect of surface treatment of NiTi alloy on its corrosion behaviour in Hanks' solution.** Wiley Periodicals, Inc., 2002.
- [15] ZINGER, O. **Differential regulation of osteoblast by substrate micro structural features.** Biomaterials, v. 26, p.1837-47, 2005.
- [16] CHESMEL, K.D.; **Cellular response to chemical and morphological aspects of bio-material surfaces:II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations.** Journal of Biomedical Materials Research, v. 29: p. 1101-1110, 1995
- [17] BRUNETTE, D.M.; CHEHROUDI, B. et al. **Use of Ti-Coated replicas to investigate the effects on fibroblasts shape of surfaces with varying roughness and constant chemical composition.** Journal of Biomedical Materials of Researt, v. 60, p. 414-44, 2002.
- [18] PONSONNET, L. **Relationship between surface properties (roughness, wettability) of Ti and Ti alloys and cell behaviour.** Materials Science of Engineering, v. 23, p. 551-60, 2003.
- [19] ZHU, X. et al. **Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses.** Biomaterials, v. 25, p. 4087-103, 2004.
- [20] SHABALOVSKAYA, S.A.; RONDELLI, G.; RETTENMAYR, M. **Nitinol Surfaces for Implantation.** Journal of Materials Engineering and Performance, v. 18, p. 470-4, 2009.
- [21] OTSUKA, K; WAYMAN, C.M.; PINA, E.A.C.; OLIVEIRA, C.S. **Shape memory materials.** Cambridge University Press, Cambridge UK, p.1-131, 1998.
- [22] CASTLEMAN, L.S.; MOTZKIN, S. M.; ALICANDRI, F.P.; BONAWIT, V.L. **Biocompatibility of Nitinol alloy as an implant material.** Journal of Biomedical Materials of Researt, 10 p. 695-731, 1976.
- [23] CUTRIGHT, S.N.; BHASKAR, B. PERIZ, R.; JOHNSON, G. COWAN. **Tissue reaction to Nitinol wire alloy.** Oral Surgery 35.4, p.578-84, 1973.
- [24] REIS, W.P. **Caracterização de ligas de níquel-titânio para ortodontia.** Dissertação. Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2001.
- [25] ANDREASEN, G.F.; MORROW, R.E. **Laboratory and clinical analyses of Nitinol wire.** American Journal of Orthodontics, 73. 2, p.142-51, 1978.

-
- [26] PEREZ-SAEZ, R.B.; RECARTE, V.; NÓ, M.L.; RUANO O.A., SAN JUAN, J. **Advances shape memory alloys processed by powder metallurgy.** Advanced Engineering Materials, 1-2, p.49, 2000.
- [27] **MEMORY METALLE**, <http://www.mrsec.wisc.edu>. Visitado em 20.10.2008.
- [28] RYHÄNEN, J.; KALLIOINEN, M.; TUUKKANEN, J.; LEHENKARI, P.; JUNILA, J.; NIEMELÄ, E.; SANDVIK, P.; SERLO, W. **Bone modeling and cell-material interface responses induced by nickel-titanium shape memory alloy after periosteal implantation.** Biomaterials, v. 20, pp. 1309-1317, 1999.
- [29] SCHOROEDER, SUTTER, F. KREKELLER, G. **Implantologia Dental.** Ed. Médica Panamericana, São Paulo, 1994.
- [30] WASILEWSKI, R. J. **The shape memory effect in NiTi: one aspect of stress assisted martensitic transformation.** Ed. Jeff Perkins. Shape Memory Effects in Alloys. Plenum Press, P.245-72, 1975.
- [31] PAIVA, P.; SAVI, M.A.; PACHECO, P.M.C.L. **Modelos constitutivos para ligas com memória de forma.** 2º Congresso Temático de aplicação de dinâmica e controle da sociedade brasileira de matemática aplicada e computacional (SBCMAC), DINCON, série Arquimedes, Vol. 2, 2003.
- [32] OTSUKA, K; SHIMIZU, K. **Pseudoelasticity and shape memory effects in alloys.** International Metals Reviews, 31.3, p.93-114, 1986.
- [33] SOUZA. **Ensaio mecânicos dos materiais metálicos**, ed. Edgard Blücher, 2ª. edição 1974.
- [34] SEHITOGLU, H. **Deformation of NiTiCu shape memory single crystals in compression.** Metallurgical and Materials Transactions 32A, 2001.
- [35] PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials an Introduction.** Springer, 2010, Third Edition, 2011.
- [36] NISHIYAMA, Z. **Martensitic Transformation.** 2. ed. Academic Press, 1978.
- [37] QUEIROGA, S.L.M. **Estudo de uma liga Cu-Al-Ni com memória de forma visando aplicações em sistema de proteção contra sobrecargas elétricas.** Dissertação. UFCG, 2006.
- [38] BRADLEY, T.; BRANTLEY, W.; ALBERTSON, B. **Differential scanning calorimeter (DSC) analyses of super elastic and nonsuperelastic nickel-titanium orthodontic wires.** American Journal of Orthodontics, 109.6, p.589-96, 1996.
- [39] DUERIG, T.W.; MELTON, K.N.; STÖCKEL, D.; WAYMAN, C.M. **Engineering aspects of shape memory alloys.** Butterworth-Heinemann Ltd., p.3-385, 1990.

-
- [40] FERNANDES, F.M.B. **Ligas com memória de forma.** Departamento de Ciências dos Materiais/Cenimat, Lisboa: Universidade de Lisboa. p.1-32, 2006.
- [41] SHAW, J.A.; E KYRIAKIDES, S. **Thermomechanical aspects of NiTi.** Journal of Mechanics Physics Solids, 43, p.1243-81, 1995.
- [42] DUERIG, T.M.; PELTON, A.; STÖCKEL D. **An overview of Nitinol medical applications.** Materials Science and Engineering, p.273-5, 1999.
- [43] JACKSON, C.M.; WAGNER H.J.; WASILEWSKI R.J. **Nitinol - the alloy with a memory: its physical metallurgy, properties, and applications.** A Report. Washington: NASA, 1972.
- [44] HODGSON, D.E.; WU; BROWN; JEFFREY, W. **Using Nitinol Alloys.** Shape Memory Applications. Inc., 2000.
- [45] THOMPSON, S.A. **An overview of nickel-titanium alloys used in dentistry.** International Endodontic Journal, 33, p.297-310, 2000.
- [46] LOPEZ H.F.; SALINAS, A.; CALDERÓN, H. **Plastic straining on the microstructure of a Ti-rich NiTi shape memory alloy.** Metallurgical and Materials Transactions, 32A, p.717-29, 2001.
- [47] NISHIDA, M.; WAYMANN, C.M.; HONMA, T. **Precipitation processes in near-equiatomic NiTi shape memory alloys.** Metallurgical Transactions, 17A, p.1505-15, 1986.
- [48] McNEESE, D.C; LAGOUDAS, T.C.; POLLOCK. **334 Diagrama de fases do NiTi.** Material Science Eng. A, p.280, 2001.
- [49] GEROLDO, A.C.B. **Estudo dos efeitos memória de forma de fios ortodônticos da liga NiTi nas condições comerciais e após tratamentos térmicos.** Dissertação. PUCRS, 2009.
- [50] RODRIGUEZ, C.; BROWN, L.C. **The mechanical properties of SME alloys.** Ed. Jeff Perkins. Shape memory effects in alloys. Plenum Press., p.29-58, 1975.
- [51] MIURA & FUJIO. **The superelastic property of the japanese Ni-Ti alloy wire for use in orthodontics.** American Journal of Orthodontics Dentofac. Orthop., 90, p.1-10, 1986.
- [52] LIU; RONG; LI, D.Y. **Experimental studies on tribological properties of pseudoelastic NiTi alloy with comparison to stainless steel 304.** Metallurgical and Materials Transaction 31A, p.2773-83, 2000.
- [53] SIZINIO, H; XAVIER, R. **Ortopedia e traumatologia.** Porto Alegre: Artmed, p.123, 2009.

-
- [54] BRANNEMARK, P.I.; HANSSON, B.O.; ADELL, R.; BREINE U.; LINDSTRÖM, U.; HALLEN, O.; ÖMAN A. **Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. Experience from a 10-years period.** *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 16, p.7-127, 1977.
- [55] DRUGACZ, J.; LEKSTON, Z.; MORAWIEK, H.; & JANUSEWSKI, K. **Use of TiNi-cobalt shape-memory clamps in the surgical treatment of mandibular fractures.** *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 53, p.665-71, 1995.
- [56] VEARICK, S.B. **Confecção e avaliação de órtese de Nitinol auto-expansível com aplicação em vias aéreas.** *Dissertação.* UFRGS, 2006.
- [57] ABATEPIETRO, C. **Tratamento pneumo-funcional no tórax flácido agudo em pacientes internados em unidade de terapia intensiva.** São Paulo: Instituto Brasileiro de Terapia Intensiva e Hospital Santa Cruz, 2006.
- [58] MAYBERRY J.; TRUNKEY D. **The fractured rib in chest wall trauma.** *Chest Surg. Clin. N. Am.* 7, p.253, 1977.
- [59] MARCHEIX. B.; MARCHEIX, L.; BROUCHET, C.; RENAUD, J.; BERJAUD, M. D. **Technique de l'ostéosynthèse costale surgical treatment of chest osteosynthesis.** França: Centre Hospitalier Universitaire Larrey, 2005.
- [60] TORAX LATERAL, <http://www.sogab.com.br/floresdias/torax.htm>. Visitado em 06.06.2011.
- [61] MENARD A.; TESTART J.; PHILIPPE J.M.; GRISE P. **Treatment of flail chest with Judet's struts.** *J. Thoracic Surgery*, 86, p.300-5, 1983.
- [62] CASALI, C.; FONTANA, G.; MORANDI, U. **Surgical stabilization of severe flail Chest.** *The Cardiothoracic Surgery Network*, CTS NET, Site visitado em 29.12.2008.
- [63] AGUIAR, E.S.V. **Manual prático de emergência em pequenos animais: aspectos básicos.** Porto Alegre, 2001.
- [64] CROWER Jr., D.T.; SHIMIZU R.K.; RABELO R.C. **Trauma torácico.** In Rabelo R.C. & Crower Jr. D.T. Ed. *Fundamentos*, 2005.
- [65] RUIZ A.A.; GOMEZ H.A.; ALFARO G.E. GRANEL C. L.; GARCIA M.G. **Sarcomas de la pared torácica, resección y reconstrucción.** *Revista Instituto Nacional de Cancerología*, 43, p.189-93, 1997.
- [66] ORTON, C. **Pared torácica.** Ed. Slater D.S. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 2 ed. São Paulo: Manole, 1998.
- [67] RYHÄNEN, J. **Biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy.** *Oulu University: Library*, 2000.

-
- [68] RUSSEL, S.M. **Design Consideration for Nitinol Bone Staples.** Journal of Materials Engineering and Performance, v. 18, n. 5, p. 831-5, 2009.
- [69] ATHANASSIADI, K.; GERAZOUNIS, M.; THEAKOS, N. **Management of 150 flail chest injuries: analysis of risk factors affecting outcome.** European Journal of Cardiothoracic Surgery, v. 26, pp. 373-376. 2004.
- [70] SOUZA, P.P.C.; ARANHA, A.M.F.; HEBLING, J. **In vitro and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements.** Dent Mater 22, p.838-44, 2006.
- [71] TENGVALL, P.; LUNDSTROM, I. **Physical chemical considerations of titanium as a biomaterial.** Clinical Materials, 9, p.115-34, 1992.
- [72] HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics.** Singapore: World scientific Publishing, Co., p.1-15, 1993.
- [73] GUTIERRES, M. **Substitutos Ósseos – Conceitos Gerais e Estados Atual.** Arquivos de Medicina, 19.4, p.153-62, 2006.
- [74] QUINTÃO, C.C. **Fios ortodônticos utilizados em fase inicial de tratamento: propriedades mecânicas e desempenho clínico.** (Tese de Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia, 2000.
- [75] WILLIAMS, D.F.; WILLIAMS R.L. **Degradative effects of the biological environment on metals and ceramics.** Ed. Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J. & Lemons J.E. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, v. 1. Academic Press, San Diego. P.260-7, 1996.
- [76] BLACK, J. **Ceramics and composites In: Black, orthopaedic biomaterials in research and practice.** Churchill Livingstone, p.133-61, 1988.
- [77] VINEY, K.; ABBAS, K.A.; ASTER, J.C.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran, Pathologic Basis of Disease, 8 ed., 2010.
- [78] JUNQUEIRA, C.L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, ed. Rio de Janeiro, 2008.
- [79] AZEVEDO, C.R.F.; HIPPERT J.R.; PASCHOAL A.C.; CRIVELARI. **Análise de falhas de implantes cirúrgicos no Brasil: a necessidade de uma regulamentação adequada.** Rio de Janeiro: Cad. Saúde Pública, 2000.
- [80] WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterial.** Progress in Biomedical Engineering, Ed. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Nether lands, 2007.
- [81] HANAWA, T.; OSHIDA, YAHIA. **Calcium phosphate naturally form on titanium electrolyte solution.** Biomaterials, 12, p.767-74, 1991.

-
- [82] OSHIDA, Y.; SACHDEVA, R.C.; MIYAZAKI, S. **Microanalytical characterization and surface modification of Ni-Ti orthodontic archwires.** Biomed Mater Eng., p.51-69, 1992.
- [83] ENDO, K.; SACHDEVA, R.; ARAKI, Y.; OHNO, H. **Effects of titanium nitride coatings on surface and corrosion characteristics of Ni-Ti alloy.** Dent. Mater., 5.13, p.228- 39, 1994.
- [84] SHABALOVSKAYA, S.A. **On the nature of the biocompatibility and medical applications of Ni-Ti. Shape Memory Alloy and Superelastic Alloys.** Journal of Biomedical Materials Research, 3.5, p.451-7, 1997.
- [85] POEHLER, O.E.M. **Degradation of metallic orthopedic implants,** Ed. Rubin, L.R. **Biomaterials in reconstructive surgery.** Mosby, St. Louis, p.158-228, 1983.
- [86] BROWN, S.A. **Corrosion and wear of biomaterials.** vol. 2. Wiley, New York: Webster J.G. Encyclopedia of Medical Devices and Instruments, 1997.
- [87] KRUGER, J. **Fundamental aspects of the corrosion of metallic implants.** Ed. Rubin L.R. Biomaterials in Reconstructive Surgery, Mosby, St. Louis, p.145-57, 1983.
- [88] CRAGG, A.H.; De JONG, S.C.; BARNHART, W.H.; LANDAS, S.K.; SMITH, T.P. **Nitinol intravascular stents results of preclinical evaluation radiology.** 189, p.775-8, 1993.
- [89] KASEMO B.; LAUSMAA, J. **The bone biomaterial interface.** Ed. Davies J.E. University of Toronto press, Toronto, p.19-32, 1991.
- [90] PFEIFFER, F. 2003. **Cell reaction to microstructural implant surfaces.** Microelectronic Engineering, 67-68, p.913-22, 2003.
- [91] O'BRIEN, B.; CARROL, W.M.; KELLY, M.J. **Passivation of Nitinol wire for vascular implants - a demonstration of benefits.** Biomaterials, 23, p.1739-48, 2002.
- [92] ZHU, X. KIM, K. H. JEONG, Y. **Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial.** Biomaterials, 22.16, p.2199-206, 2001.
- [93] SUL, Y.T. **Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants.** Biomaterials, 23, p.1809-17, 2002.
- [94] CHEN, M. F.; YANG, X. J.; LIU, Y.; ZHU, S. L.; CUI, Z. D.; MAN, H. C. **Study on the formation of na apatite layer on NiTi shape memory alloy using a chemical treatment method.** Surface & Coatings Technology, v. 173, pp. 229-234, 2003.
- [95] SHI, P.; CHENG, F.T.;MAN, H.C. **Improvement in corrosion resistance of NiTi by anodization in acetic acid.** Materials letters, 61, p.2385-8, 2007.

-
- [96] CÉLULA HUMANA, [http:// www.proteccionradiologica.files.wordpress.com](http://www.proteccionradiologica.files.wordpress.com). Visitado em 25.08.2011.
- [97] COLÁGENOS, <http://www.gastroenterologie.com.br/diccionario/letrac.html> visitado em 14.03.2011.
- [98] OSTEOLASTOS, [http:// www.enq.ufsc.br](http://www.enq.ufsc.br). Visitado em 14.03.2011.
- [99] ANSELME, K. **Osteoblast adhesion on biomaterials**. *Biomaterials*, 21.7, p.667-81, 2000.
- [100] ANSELME, K.; BIGERELLE, M. **A kinetic approach to osteoblast adhesion on biomaterial surface**. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, v. 75A, n. 3, pp. 530-540, 2005.
- [101] SILVA FILHO, F.C.; MENEZES, G.C. **Osteoblasts attachment and adhesion: how bone cells fit fibronectin-coated surfaces**. *Mater. Sci. Eng.*, 24, p.637-41, 2004.
- [102] ANSELME, K.; BIGERELLE, M. **Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblasts long-term adhesion**. *Acta Biomaterialia* 1, p.211-22, 2005.
- [103] VAN OSS, C.J. **Interfacial forces. In aqueous media**. Marcel Decker Inc. N.Y., 1994.
- [104] VAN OSS, C.J. **Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitopeparatope binding**. *Molecular Immunology* 32.3, p.199-211, 1995.
- [105] BIGERELLE M. **Improvement in the morphology of Ti-based surfaces; a new process to increase in vitro human osteoblast response**. *Biomaterials*, 23, p.1563-77, 2002.
- [106] LANGE, R. et al. **Cell extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristic of titanium surfaces depend on the roughness of the material**. *Biomolecular Engineering*, 19, p.255-61, 2002.
- [107] FROSCHE, K.H. et al. **Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants**. *Journal of Orthopaedic Research*, 21, p.213-23, 2003.
- [108] ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. **Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment proliferation and differentiation**. *Braz. Dent. Journal*, 14, p.16-21, 2003.
- [109] CHESMEL, K. D.; CLARK, C. C.; BRIGHTON, C. T.; BLACK, J. **Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces: The biosynthetic and migratory response of bone cell populations**. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, v. 29, n. 9, pp. 1101-1110, 1995.

-
- [110] RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine**. Ed. San Diego, CA: Academic Press., 1996.
- [111] BURKARTER, E. **Construção de imagens por padrões hidrofóbico/hidrofílico**. Dissertação de Mestrado em Ciências, Universidade Federal do Paraná, 2006.
- [112] UWEB, University of Washington Engineered Biomaterials. [online]. Washington, United States of America. Accessed January 2006. Disponível em: <http://www.uweb.engr.washington.edu>, visitado em 19.03.2011.
- [113] BOYAN, B.D. et al. **Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response**. Biomaterials, 17, p.137-46, 1996.
- [114] ZHU, X. KIM, K. H. JEONG, Y. **Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial**. Biomaterials, 22.16, p.2199-206, 2001.
- [115] FIOCRUZ. [http:// www.invivo.fiocruz](http://www.invivo.fiocruz) 2006. Acesso em 10.02.2011.
- [116] SENA, L.A.; ROCHA, N.C.C.; ANDRADE, M.C.; SOARES, G.A. **Bioactivity assessment of titanium sheets electrochemically coated with thick oxide film**. Surf. Coat. Tech., 166, p. 254-8, 2003.
- [117] GOODHEW, P.J.; HUMPHREYS, J.; BEANLAND, R. **Electron Microscopy and Analyses**. 3. ed. Taylor & Francis, 2001.
- [118] MANNHEIMER, W.A. **Microscopia dos Materiais – Uma Introdução**, Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. E-Papers, 2002.
- [119] CRUZ, T.G. **Leis de Escala e Dimensão Fractal em Filmes Finos: Microscopia de Força Atômica e Voltametria Cíclica**. Revista Physicae, 1, p.29-30, 2000.
- [120] ZHANG X.; YONZON C.R.; YOUNG M.A.; STUART D.A.; VAN DUYN R.P. **Surface-enhanced Raman spectroscopy biosensors: excitation spectroscopy for optimisation of substrates fabricated by nanosphere lithography**. IEE Proc.-Nanobiotechnol, 152.6, p.195-206, 2005.
- [121] GUIDOLIN, R. et al. **Esterilização de soros e vacinas por radiação gama de cobalto**. Revista Saúde Pública, S. Paulo 22, p.113-7, 1988.
- [122] NA, Y.; WANG, Q.; NAKANO, K.; TOMIDA, M.; KAWAKAMI, T.; ZHANG, Y. **L929 Cell Adhesion on the Surface Oxidized NiTi Shape Memory Alloy**. Journal of Hard Tissue Biology, v. 20, n. 1, pp. 53-58, 2011.
- [123] L929, LINHAGEM CELULAR, [www. Nce. Ufrj.br/brnj/busca](http://www.Nce.Ufrj.br/brnj/busca) 1.asp? bcrj. Acesso em 09.08.2007, revisitado em 29.06.2012).

-
- [124] FELIPE, K.B. **Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT**. UFSC, 2011.
- [125] SHAPE MEMORY ALLOY, [HTTP://en.wikipedia.org/wiki/Shape_memory_alloy](http://en.wikipedia.org/wiki/Shape_memory_alloy). Visitado em 11.11.2010.
- [126] BURKARTER, E. **Construção de imagens por padrões hidrofóbico/hidrofílico**. Dissertação de Mestrado em Ciências, Universidade Federal do Paraná, 2006.
- [127] SHELDON, A. B.; BALLA, V. K.; DAVIES, N. M.; BOSE, S.; BANDYOPADHYAY, A. **Bone cell-materials interactions and Ni ion release of anodized equiatomic NiTi alloy**. Acta Biomaterialia, v. 7, pp. 1902-1912, 2011.
- [128] LEVINTANT-ZAYONTS, N.; KUCHARSKU, S. **Surface characterization and wear behavior of ion implanted NiTi shape memory alloy**. Vacuum, v. 83, pp. s220-s223, 2009.
- [129] VOJTECH, D.; JOSKA, L.; LEITNER, J. **Influence of a controlled oxidation at moderate temperatures on the surface chemistry of Nitinol wire**. Applied Surface Science 254, p.5664-9, 2008.
- [130] TREPANIER, C.; TABRIZIAN, M.; YAHIA, L.H.; BILODEAU, L.; PIRON, D.L. **Effect of modification of oxide layer on NiTi stent corrosion resistance**. Journal of Biomedical Materials Research, 43, p.433-0, 1998.
- [131] BERNARD S.A.; BALLA V.K.; DAVIES N.M.; BOSE S.; BANDYOPADHYAY A. **Bone cell-materials interactions and Ni ion release of anodized equiatomic NiTi alloy**. Acta Biomaterialia, 7, p.1902-12, 2011.
- [132] HORIUCHI Y.; HORIUCHI M.; HANAWA T.; SOMA K. **Effect of surface modification on the photocatalysis of Ni-Ti alloy in orthodontics**. Dental Materials Journal, 26.6, p.924-29, 2007.
- [133] RUIQIANG H.; XIAOBO H.; TIAN L.; HE Z.; TANG B. **Preparation, characterization, corrosion behavior and bioactivity of Ni₂O₃ – doped TiO₂ nanotubes on NiTi alloy**. Electrochimica Acta, 70, p.382-93, 2012.
- [134] ELAHINIA M.H., HASHEMI M., TABESH M., BHADURI S.B. **Manufacturing and processing of NiTi implants: a review**. Progress in Materials Science, 57.5, p.911-46, 2012.
- [135] CHENG, F. T.; SHI, P.; PANG, G. K. H.; WONG, M. H.; MAN, H. C. **Microstructural characterization of oxide film formed on NiTi by anodization in acetic acid**. Journal of Alloys and Compound, v. 438, pp. 238-242, 2007.
- [136] DHAGE, S.R.; VANDANA, D.C.; SAMUEL, V.; RAVI, V. **Synthesis of nanocrystalline TiO₂ at 100°C**. Materials Letters, 58.17, p.2310-3, 2004.

-
- [137] FIRSTOV, G.S.; VITCHEV, R.G.; KUMAR, H.; BLANPAIN, B.; VAN HUMBEECK, J. **Surface oxidation of NiTi shape memory alloy.** Biomaterials, 23.24, p.4863-71, 2006.
- [138] VOJTECH, D.; NOVÁK, P.; NOVÁK, M.; JOSKA, L.; FABIÁN, T.; MAIXNER, J.; et al. **Cyclic and isothermal oxidations of Nitinol wire at moderate temperatures.** Intermetallics 16.6, p.424-31, 2008.
- [139] WIRTH, C.; COMTE, V.; LAGNEAU, C.; EXBRAYAT, P.; LISSAC, M.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; et al. **Nitinol surface roughness modulates in vitro cell response: a comparison between fibroblasts and osteoblasts.** Materials Science and Engineering, 25, p.51-60, 2005.
- [140] PONSONNET, L.; COMTE, V.; OTHMANE, A.; LAGNEAU, C.; CHARBONNIER, M.; LISSAC, M. et al. **Effect of topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel titanium substrates.** Materials Science and Engineering, 21, p.157-65, 2002.
- [141] SHABALOVSKAYA, S. A.; ANDEREGG, J. W.; UNDISZ, A.; RETTENMAYR, M.; RONDELLI, G. C. **Corrosion resistance, chemistry, and mechanical aspects of Nitinol surfaces formed in hydrogen peroxide solutions.** Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials, v. 100B, n. 6, pp. 1490-1499, 2012.
- [142] HUAN, Z.; FRATILA-APACHITEI, L. E.; APACHITEI, I.; DUSZCZYK, J. **Porous NiTi surfaces for biomedical applications.** Applied Surface Science, v. 258, pp. 5244-5249, 2012.
- [143] FILIP, P.; LAUSMAA, J.; MUSIALEK, J.; MAZANEC, K. **Structure and surface of NiTi human implants.** Biomaterials, v. 22, pp. 2131-2138, 2001.
- [144] MORGAN, N. B. **Medical shape memory alloy applications – the market and its products.** Materials Science and Engineering A, v. 378, pp. 16-23, 2004.
- [145] LIU; XIAOMEI; et al. **Influence of substructure surface chemistry-energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFob 119; Phenotypic and genotypic responses observed in vitro.** Biomaterials, v. 28, p.4535-50, 2007.
- [146] YANG, C.; CHEN, F.; CHEN, S. **Anodization of the dental arch wires.** Materials Chemistry and Physics, v. 100, pp. 268-274, 2006.
- [147] CHU, C. L.; WANG, R. M.; HU, T.; YIN, L. H.; PU, Y. P.; LIN, P. H.; WU, S. L.; CHUNG, C. Y.; YEUNG, K. W. K.; CHU, P. K. **Surface structure and biomedical properties of chemically polished and electropolished NiTi shape memory alloys.** Materials Science and Engineering C, v. 28, pp. 1430-1434, 2008.

-
- [148] CUI, Z.D.; MAN, H.C.; YANG, X.J. **Characterization of the laser gas nitrided surface of NiTi shape memory alloy.** Applied Surface Science, 208-209, p.388-93, 2003.
- [149] SUI, J.H.; CAI, W. **Formation of ZrO₂ coating on the NiTi alloys for improving their surface properties.** Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 251.2, p.402-6, 2006.
- [150] UNDISZ, A.; SCHREMPEL, S.; WESCH, W.; RETTENMAYR, M. **In situ observation of surface oxide layers on medical NiTi alloy during straining.** Journal of Biomedical Materials Research, 88.4, p.1000-9, 2009.
- [151] VOJTECH, D.; VODEROVÁ, M.; FOJT, J.; NOVÁK, P.; KUBÁSEK, T.; **Surface structure and corrosion resistance of short-time heat-treated NiTi shape memory alloy.** Applied Surface Science 257.5, p.1573-82, 2010.