

## ESTUDO DE HEMOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* DE TITÂNIO PURO E LIGA DE TITÂNIO 30% TÂNTALO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Grazielle A. Santos<sup>1</sup> (IC), Mirian L. M. N. Melo (PQ)<sup>1</sup>, Daniela Sachs (PQ)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Itajubá.

**Palavras-chave:** Biocompatibilidade. Biomaterial. Implantes. Ti-30Ta.

### Introdução

A demanda por materiais para implantes têm crescido nos últimos anos por diversos fatores, como o envelhecimento populacional, doenças degenerativas e o aumento de traumas causados em acidentes (GEETHA *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2015). Nesse cenário, a pesquisa e a utilização de materiais metálicos como dispositivos biomédicos estão em evidência devido às suas propriedades mecânicas, como alta resistência à fadiga, à corrosão e ao desgaste (MOORE *et al.*, 2017).

Um grande obstáculo encontrado para se eleger biomateriais para implantes é combinar as propriedades mecânicas e biológicas em um único material, para que o mesmo tenha baixo peso específico, alta durabilidade e boa compatibilidade. A diferença entre as propriedades mecânicas do material e a do tecido ósseo é um outro problema, uma vez que, por exemplo, quando o módulo de elasticidade do material implantado é muito maior que o módulo do osso, tem-se a distribuição não homogênea de tensões, ocasionando a reabsorção óssea (fenômeno conhecido como *stress shielding*) (CAPELLATO *et al.*, 2013).

Dentre os biomateriais em estudo para serem usados na substituição do tecido ósseo, o titânio e suas ligas estão em destaque, posto que apresentam ótimas propriedades mecânicas. Como o titânio comercialmente puro (Ti-cp) é um material inerte e com módulo de elasticidade superior ao do osso, sua combinação com elementos de liga visa reduzir tal propriedade (BOSE *et al.*, 2017).

Trabalhos com o sistema binário Titânio-Tântalo (Ti-Ta) observaram que a adição de tântalo na proporção de 30% na matriz de titânio faz com que o módulo de elasticidade do material passe a ser admissível em relação ao módulo do osso. Além de menor módulo, a liga Ti-30Ta apresenta uma elevada resistência à corrosão (CAPELLATO *et al.*, 2013; ZHOW *et al.*, 2005).

No que tange à resposta do hospedeiro, uma boa hemocompatibilidade e compatibilidade celular são

requisitos essenciais para que biomateriais sejam adotados em implantes ósseos (ASTM F576). Devido ao fato de que o material entrará em contato com os sistemas biológicos e seus fluidos (como o sangue), é necessário observar essa interação e verificar a viabilidade da sua utilização.

Materiais hemolíticos quando em contato com o tecido sanguíneo podem levar à liberação da hemoglobina dos eritrócitos afetados. Como consequência, esta proteína livre pode acometer danos vasculares e renais, como também disfunções em vários outros órgãos, visto que são vulneráveis a reações de oxidação (ASTM F576). Assim, a compreensão do nível de hemólise gerada por biomateriais é fundamental para que o material possa ser aplicado em dispositivos biomédicos.

Desse modo, a presente pesquisa verifica a hemocompatibilidade do biomaterial Ti-30Ta, empregando teste de hemólise. O estudo *in vitro* é uma etapa experimental essencial para que o biomaterial possa ser usado na área ortopédica sem apresentar transtornos e toxicidade aos pacientes.

### Metodologia

Para determinar a propriedade hemolítica do Ti-cp e da liga Ti-30Ta realizou-se o teste de hemólise, de acordo com a norma técnica ASTM F756. O estudo envolve a exposição do material de teste a uma suspensão de células sanguíneas e a determinação da quantidade de hemoglobina liberada. O teste é feito com sangue humano em solução tampão a base de citrato. Destaca-se que os biomateriais em estudos foram cedidos pela docente da Universidade Estadual Paulista (UNESP), a professora Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Rosifini Alves Claro. Os discos de Ti e Ti-30Ta recebidos apresentam 13 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

No experimento, amostras de Ti-cp e Ti-30Ta foram inicialmente expostas a luz ultravioleta (UV) por 1 hora, a fim de promover a esterilização. Em seguida, os biomateriais foram adicionados em tubos

Falcon com 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% e incubados a 37° C por 30 minutos. O sangue necessário para o teste foi coletado de um voluntário sadio sob o método a vácuo. Os tubos para coleta de sangue continham 3,5 mL de anticoagulante citrato de sódio 3,2%. Com a coleta do tecido sanguíneo, os tubos foram agitados manualmente para a homogeneização do sangue com o anticoagulante.

Posteriormente, as amostras foram retiradas das estufas e adicionou-se 0,2 mL do sangue coletado, levando-as novamente na estufa a 37° C por 60 minutos. Depois desse período de incubação, as amostras foram centrifugadas, em uma centrífuga Bio Eng modelo BE 4000-Brushless, por 5 minutos a uma velocidade de 2500 rpm. Para finalizar, realizou-se a leitura da transmitância do sobrenadante das amostras centrifugadas em um espectrofotômetro Femto C432, empregando o comprimento de onda de 540 nm. Os valores de transmitância foram convertidos em absorbância e, então, a taxa de hemólise foi calculada.

Foi preparado um grupo controle com 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, onde não ocorre hemólise. O controle positivo foi preparado com 10 mL de água destilada, onde ocorre 100% de hemólise. Em ambos os tubos foram colocados 0,2 mL da amostra de sangue (quantidade padronizada) e repetidos os procedimentos de incubação e leitura já mencionados.

## Resultados e discussão

Segundo a Associação Americana de Testes e Materiais (ASTM), o teste de hemólise diz respeito a um teste de citotoxicidade *in vitro*, no qual a biocompatibilidade de um biomaterial é avaliada ao ser posto em contato com o sangue. O protocolo desenvolvido esclarece a resposta dos glóbulos vermelhos quando em contato com os materiais estudados.

Quando o material não é hemocompatível, ocorre o rompimento da membrana celular dos eritrócitos e, conseqüentemente, tem-se a liberação da hemoglobina das hemácias. E é através da quantificação da taxa de hemoglobina liberada que torna-se possível determinar se o material pode ser considerado hemolítico ou não.

Na presença de um biomaterial hemolítico, os níveis aumentados de hemoglobina plasmática são capazes de induzir efeitos adversos e tóxicos, como stress ao rim e outros órgãos. Neste sentido, as taxas para a ocorrência de hemólise podem ser encontradas na norma técnica ASTM F756-08 (2013), as quais estão representadas na Tabela 1.

Índice Hemolítico	Grau Hemolítico
0 - 2	Não hemolítico
2 - 5	Levemente hemolítico
> 5	Hemolítico

Tabela 1 - Taxas definidas pela ASTM F756-08 para a ocorrência de hemólise.

A taxa de hemólise do Ti-cp e Ti-30Ta obtidas no estudo *in vitro* estão sistematizados na Figura 1.

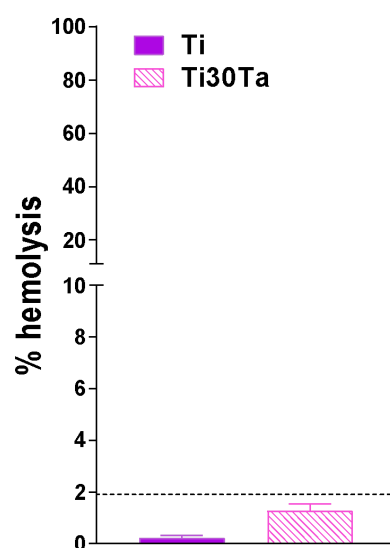


Figura 1 – Porcentagem de hemólise de Ti-cp e Ti-30Ta.

Como observa-se na Figura 1, tanto a liga Ti-30Ta quanto Ti-cp apresentam índice hemolítico entre 0 e 2%. Considerando as taxas definidas pela ASTM F756-08 na Tabela 1, entende-se que os materiais não induzem hemólise quando em contato com as hemácias. Isso significa que ambos os materiais são hemocompatíveis.

Apesar do Ti-cp apresentar menor porcentagem de hemólise, conforme Figura 1, o mesmo possui módulo de elasticidade ( $\cong 100$  GPa) muito superior ao módulo de elasticidade do osso (que varia na magnitude de 4 a 30 GPa), o que possibilita a ocorrência de fadiga e reabsorção óssea. Nesta situação, a liga Ti-30Ta é vantajosa para substituir o titânio puro, haja vista que o seu módulo (69 GPa) é mais semelhante ao do tecido ósseo, assegurando a funcionalidade do implante.

Portanto, esses resultados sugerem que a liga Ti-30Ta é um biomaterial que não causará hemólise quando entrar em contato com o sangue, de modo que pode ser um potencial material a ser utilizado para aplicações biomédicas.

### Conclusões

Conclui-se, após a realização do estudo *in vitro* de hemocompatibilidade, que a liga de Ti-30Ta não é hemolítica e pode ser um biomaterial promissor na confecção de implantes biomédicos.

### Agradecimentos

À Universidade Federal de Itajubá e à Diretoria de Pesquisa pela concessão da bolsa institucional de iniciação científica.

### Referências

ASTM F756-08, Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials.

BOSE, S. *et al.* Introduction to Biomaterials and Devices for Bone Disorders. In: BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. (Eds.). **Materials and Devices for Bone Disorders**. 1. ed. Pullman, WA: Elsevier Inc., 2017. p. 1–27.

CAPELLATO, P.; RIEDEL, N. A.; WILLIAMS, J. D.; MACHADO, J. P. B.; POPAT, K. C.; ALVES CLARO, A. P. R. - **Surface Modification on Ti-30Ta alloy for Biomedical Application - Engineering** - 2013.

GEETHA, M.; SINGH, A.K.; ASOKAMANI, R.; GOGIA, A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review - **Progress in Materials Science** 54, 2009.

MOORE, B. *et al.*. Deposition methods for Microstructured and Nanostructured coatings on metallic bone implants: A review. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2017, 2017.

PIRES, A. L. R. *et al.* Biomateriais: Tipos, Aplicações E Mercado. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, p.957-971, 2015.

ZHOU, Y. L.; NIINOMI, M.; AKAHORI, T.; FUKUI, H.; TODA, H. Corrosion resistance and biocompatibility of Ti–Ta alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering A** - 2005.