

## HEMOCOMPATIBILIDADE DA LIGA CANDIDATA A BIOMATERIAL: Ti-Si-B

Karla R P<sup>1</sup>, Lauralice C F C<sup>1</sup>, André L P<sup>2</sup>, Alfeu S R<sup>3</sup>, Renata D J<sup>4</sup>.  
R: Laerte J. T. Mendes, 540 Centenário - Monte Alto, 15910-000 S.P.  
Brasil.<sup>1</sup> kkbimedica@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, <sup>2</sup> Faculdade Tecnológica de Sorocaba, <sup>3</sup> Universidade do Vale do Paraíba, <sup>4</sup> Centro Universitário de Araraquara.

### **Resumo.**

*Acidentes com veículos auto-motores, práticas esportivas e processos patológicos degenerativos (exemplo, a osteoporose) vêm aumentando consideravelmente e são em situações como essas, que determinados biomateriais se encaixam, devido à suas capacidades clínicas e pós-operatória. Isso leva a reconhecer, a necessidade em estar desenvolvendo pesquisas nessa área, investimentos e novas pesquisas poderão trazer novas alternativas de aplicação, principalmente se o resultado for em se tratando de materiais com custos mais acessíveis.*

*Esse trabalho é baseado em ensaios que testaram a eficiência de um candidato à biomaterial, a liga metálica Ti-Si-B, quando em contato direto com o sangue. O método de hemocompatibilidade é embasado nas normas internacionais ISO 10993-4 Biological Evaluation of Medical Devices e ASTM 756 – Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Material, tem a função de mostrar alterações nos componentes sanguíneos. Neste trabalho, usou-se ensaios in-vitro, esse processo teve como finalidade averiguar a possível aplicação do material para uso clínico, como parte de uma série de estudos de biocompatibilidades ainda a serem realizados.*

**Palavras-chave:** Hemocompatibilidade, Liga metálica, Biomaterial.

## INTRODUÇÃO

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<sup>(1, 5, 9)</sup>. 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<sup>(9)</sup> em aplicações, por exemplo, nas áreas de ortopedia, cardiologia – como parte de dispositivos em válvulas e odontologia. Assim o uso de biomateriais e a busca de novas possibilidades de ligas que estão sendo testadas<sup>(6)</sup>, vem crescendo, não somente na questão científica em que o mesmo está inserido, mas principalmente no que se refere a condições para a melhoria na qualidade de vida das pessoas que precisam clinicamente serem assistidas com esses dispositivos implantáveis. Para verificar a interação material *versus* meio biológico, testes *in-vitro* e *in vivo* são realizados. Este trabalho está embasado nas Normas Internacionais preconizadas pela *ISO 10993-4 - Biological Evaluation of Medical Devices - Part 4: Selection of tests for interactions with blood*, pela *ASTM F-756 - Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Material* e nos métodos de análise clínica hematológica.

Dentro do processo de biocompatibilidade o material deve atingir um resultado clínico esperado<sup>(2)</sup>. Nesse estudo, realizaram-se testes de hemocompatibilidade, onde a liga metálica TiSiB<sup>(6)</sup> esteve em contato direto com o sangue (*in-vitro*), num período de 72 horas. Outras ligas também foram usadas como parâmetro (F-138, Ti grau 2, CrCoMo) e após esse tempo, o sangue foi analisado microscopicamente,

observando a presença ou não de possíveis alterações. No processo de avaliação da hemocompatibilidade, estão envolvidos processos de análises laboratoriais clínicos, que são: Leucograma - fornece informações referentes às células brancas, para poder avaliar possíveis alterações morfológicas nas células rereferidas;<sup>(3, 8, 10)</sup> . Eritrograma: fornece informações referentes às células vermelhas, através de vários métodos como a contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito, cálculos dos índices hematimétricos, pH e observações morfotintoriais<sup>(3, 4, 7, 8, 10)</sup> .

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Coleta do material.**

- foram realizados dois ensaios (para a liga TiSiB) e em cada um foram coletadas quatro amostras sanguíneas (humana) de 5 ml cada, sendo duas amostras coletadas em tubos com anticoagulante EDTA e duas em tubos sem anticoagulante (para verificar tempo de coagulação); para as ligas metálicas usadas como parâmetro, foram coletadas duas amostras para cada material, seguindo o padrão citado acima e realizou-se apenas um ensaio.

-as amostras com anticoagulante e sem anticoagulante foram divididas em:

\*Amostra A – sangue com liga metálica;

\*Amostra B – somente sangue (amostra utilizada como padrão de normalidade para os testes);

### **Análises realizadas.**

- dosagem de hemoglobina (Hb), pH, hematócrito (Ht), índices hematimétricos (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)), tempo de coagulação sanguínea; contagem global de hemácias, leucócitos e plaquetas e confecção do esfregaço sanguíneo para análise morfológica;

- as análises foram realizadas durante um período de 72 horas, exceto a dosagem do pH sanguíneo, que foi somente avaliado no momento imediato e no de 72 horas e a amostra para o tempo de coagulação, que foi realizada apenas uma vez em cada ensaio (no momento imediato da coleta);

- as dosagens de hemoglobina, índices hematimétricos, contagem global de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, foram realizadas no aparelho *Cobas Micros* e o pH foi medido no aparelho *Roche OMNI C*;

- a análise morfológica das células sanguíneas foram realizadas em microscópio óptico, com objetiva de imersão (100x).

\*As unidades utilizadas para os valores das amostras estão na Tab. 1. Os valores são estabelecidos e utilizados em análises laboratoriais pelo Laboratório da Santa Casa de Misericórdia – Uniara.

Tabela 1. Valores de Referências Laboratoriais\*.

<b>Analitos</b>	<b>Valores</b>
<b>Hemácias</b>	<b>Homem:</b> 4,5 - 6,0 milhões por mm <sup>3</sup> <b>Mulher:</b> 4,0 – 5,5 milhões por mm <sup>3</sup>
<b>Leucócitos</b>	5000 – 10000/ mm <sup>3</sup>
<b>Hb</b>	<b>Homem:</b> 14 – 17 g/dl <b>Mulher:</b> 11,5 - 16 g/dl
<b>Ht</b>	<b>Homem:</b> 40 – 54 g% <b>Mulher:</b> 35 – 47 g%
<b>VCM</b>	87 (+/- 5) flt
<b>HCM</b>	29 (+/- 2) pg
<b>CHCM</b>	34 (+/- 2) g/dl
<b>Plaquetas</b>	200000 - 400000
<b>pH</b>	7,35 – 7,45
<b>Tempo de Coagulação</b>	5 - 15 minutos

As ligas metálicas: F-138, Co-Cr-Mo (Cobalto-Cromo-Molibdênio) e liga de Ti grau 2 (Titânio) que são biomateriais metálicos já bastante conhecidos, foram utilizadas com a intenção de se ter parâmetros qualitativos para os ensaios de hemocompatibilidade efetuados. A tabela abaixo mostra as ligas ensaiadas com a respectiva composição química.

Tab. 2 – Composição química nominal das ligas (% em peso).

Ligas	C	Mn	Cr	Ni	Mo	N / H / O	Cu/B	Si	Outros
Ti grau 2 (ASTM 67)	0,01 max	-	-	-	-	0,03 máx/ 0,015 máx/ 0,25 máx	-	-	Ti Bal.
Co-Cr-Mo (ASTM 95)	0,35	1,0	27 - 30	1,0	5-7	-	-	1,0	Co Bal.
Aço Inox (ASTM F138)	0,03 máx	2,0	17-19	13-15,5	2-3	0,1 máx/ -/ -	Cu: 0,5	1,0 máx	Fe Bal.
<b>Ti Si B</b>	-	-	-	-	-		<b>B: 5</b>	<b>10</b>	<b>Ti Bal.</b>

### Microestrutura da liga TiSiB.

A liga do sistema Ti Si B utilizada foi, conforme tabela anterior, a de composição nominal Ti-10Si-5B, que após fusão foi tratada a 1250°C por 16 horas. A microestrutura resultante é formada pela fase denominada  $\alpha$  ( $Ti_6Si_2B$ ), fase  $\beta$  (TiB) e matriz de Ti, conforme mostra a Fig. 1 a seguir.

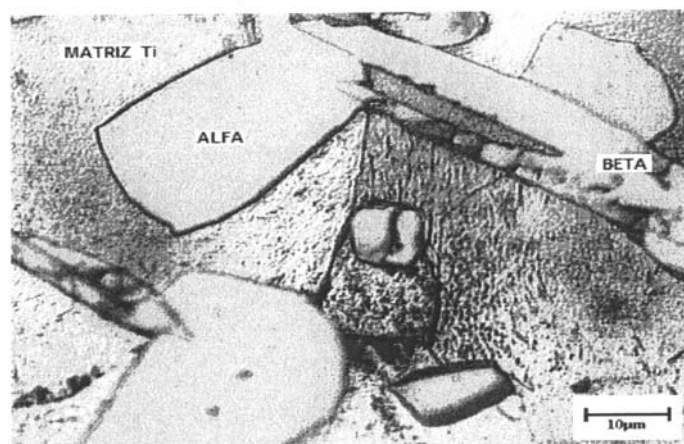


Fig. 1. Liga Ti 10 Si 5B após tratamento térmico a 1250°C por 16 horas. Aumento 500x. Ataque: Kroll.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela 3 demonstra todos os ensaios realizados com as distintas ligas metálicas, onde observamos a avaliação global das hemácias, dos leucócitos, índices hematimétricos, hemoglobina, hematócrito, pH inicial e final e tempo de coagulação, num período de 72 horas. Os valores demonstrados na Tab.3 foram obtidos através da média.

Tabela 3. Ensaio das Ligas: Ti-Si-B, Sangue sem liga, F-138, Ti e Cr-Co-Mo (média dos valores).

Analitos	Sangue e liga Ti-Si-B	Sangue sem liga	Sangue e F-138	Sangue e Ti	Sangue e Cr-Co-Mo
Leucócito	3.3	3.3	3.6	3.4	3.3
Hemácia	5.35	5.45	5.5	5.24	5.26
Hb	14.65	14.5	15.3	13.08	12.9
Ht	43.5	44	43.6	43.05	43.2
VCM	82.1	82.3	82.6	81.05	81.4
HCM	27	27.1	28.3	26.1	26.2
CHCM	32.2	33.1	34.5	30.8	31.4
Plaqueta	223	228	218	229	228
pH inicial	7.16	7.15	7.33	7.35	7.32
pH final	7.2	7.23	7.33	7.38	7.35
Tempo de Coagulação	6'	7' 42''	5	5' 25''	5'

### Ensaio de Comparação.

A tabela 4 demonstra as análises comparativas em porcentual entre as Ligas: F-138, Ti gau 2, Cr-Co-Mo e Sangue sem Liga, para saber se o porcentual é para mais ou para menos, usar a Tab.3 como parâmetro.

Tab. 4 - Diferenças em % do sangue com liga Ti-Si-B comparada com o sangue sem liga metálica e com outras ligas (biomateriais).

	Sangue sem liga	Sangue com liga F-138	Sangue com liga Ti	Sangue com liga Cr-Co-Mo
Leucócito	0	8.3	2.9	0
Hemácia	1.8	2.7	2.09	1.7
Hb	1	4.2	12	13.5
Ht	1.1	0.2	1.04	0.7
VCM	0.2	0.6	1	0.9
HCM	0.4	4.6	3.4	3
CHCM	2.7	6.7	4.5	2.5
Plaquetas	2.2	2.3	2.7	2.2
pH inicial	0.1	2.3	2.6	2.2
pH final	0.4	1.8	2.4	2
Tempo de Coagulação	19.1	20	14.3	20

O número total de leucócitos das amostras teve uma variação entre 3.3 a 3.6 mil leuc./mm<sup>3</sup>, o que não significa leucopenia (diminuição de leucócitos), pois o valor está dentro do limite de normalidade (“valor normal individual”) do doador da amostra sanguínea.

Pode-se observar uma elevação da hemoglobina, nas amostras que entraram em contato com a liga metálica Ti-Si-B, comparada às outras ligas e ao sangue sem contato com liga metálica. Essa alteração é decorrente da lise das hemácias e pode estar relacionada também com a interação do anticoagulante em destruir as células, pois os valores obtidos, não são consideráveis neste caso, quando comparamos com os valores os quais temos como padrão de normalidade e quando comparamos aos valores de referência laboratorial estabelecidos.

Na determinação do hematócrito onde demonstrou-se a porcentagem das hemácias em relação ao sangue total, também não apresentaram-se alterações consideráveis quando comparadas aos valores de referências laboratoriais utilizados.

Os Índices Hematimétricos também mantiveram-se dentro dos limites de alterações aceitáveis, tanto em relação aos valores de comparação determinados nas análises padrão de normalidade, tanto quando comparados com os valores de referências usados em análises laboratoriais estabelecidas.

Observando os dados pode-se concluir que as plaquetas do sangue com a liga Ti-Si-B, quando comparadas ao que não entrou em contato com a liga, tiveram uma diminuição de 2.2%, a qual, não tem consideração clínica, as variações resultantes do contato do sangue com as outras ligas, também não são consideráveis.

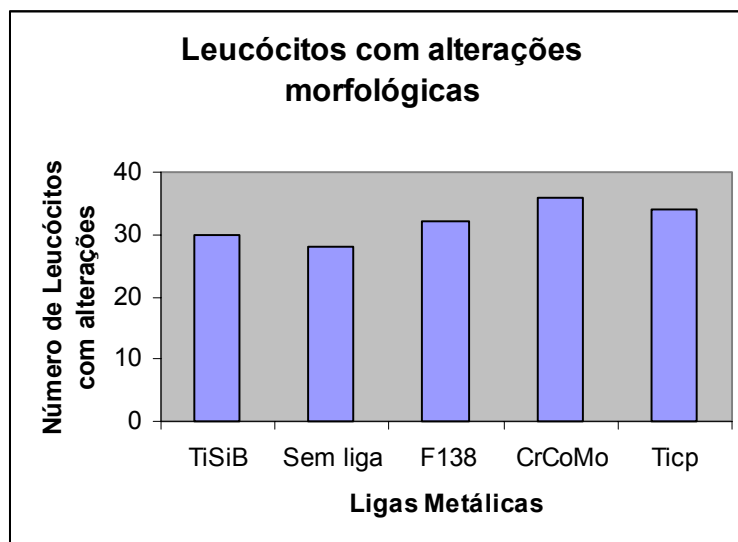
O tempo de coagulação mostrou uma variação maior de 10% entre o sangue com liga metálica, sangue sem contato da liga e sangue com outras ligas (biomateriais), mas mesmo assim não se considera alteração, pois avaliando individualmente cada ensaio, estes, mantiveram-se dentro dos valores de referências laboratoriais clínicos.

O pH sanguíneo manteve-se dentro dos valores de referências laboratoriais, quando compara-se o sangue com liga metálica Ti-Si-B e o sangue sem contato com a liga, a variação é menor do que quando compara-se com o sangue que entrou em contato com as outras ligas (biomateriais), mas a alteração não é

considerável, está dentro dos valores permitidos para pH sanguíneo, mostrando que o equilíbrio ácido-base do sangue, não se alterou frente ao contato com a liga metálica candidata a biomaterial (Ti-Si-B).

### **Análise Morfológica.**

As análises dos esfregaços sanguíneos demonstraram, tanto para hemácias, quanto para leucócitos alterações as são denominadas de artefatos, onde a estrutura morfológica das células tiveram algumas anormalidades, como por exemplo, hemácias crenadas ou em gota de lágrima ou no caso dos leucócitos, com vacúolos ou lesões na membrana celular, isto provavelmente é decorrente do tempo que o sangue ficou em contato com o anticoagulante EDTA e não pelo fato de ter entrado em contato com as ligas metálicas. Para confirmação dessa afirmação, observamos os resultados obtidos nos esfregaços de sangue que não entraram em contato com a liga ( esse esfregaço é tido como padrão 100% de normalidade), e também comparamos com os esfregaços de sangue que entraram em contato com as ligas metálicas F-138, Cr-Co-Mo e Ti grau 2, que já são consideradas biomateriais, todas as análises morfológicas das hemácias e leucócitos estão dentro do padrão de normalidade, seguindo os valores de referências laboratoriais. O gráfico 1 demonstra os dados obtidos para Leucócitos somente, já que as anormalidades das hemácias foram apenas qualificadas e não quantificadas.



Graf.1 Alterações morfológicas de Leucócitos.

## CONCLUSÃO

Os métodos utilizados para avaliação do sangue no processo de Hemocompatibilidade da Liga Metálica Ti-Si-B, demonstraram um excelente resultado, pois as alterações encontradas não são consideráveis, quando comparadas entre si e quando comparadas com os valores de referências laboratoriais clínicos.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP- que tornou financeiramente possível a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Azevedo, CRF; Hippert Jr., E. (2000), Análise de falhas de implantes cirúrgicos no Brasil: a necessidade de uma regulamentação adequada. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.
2. Kawachi, Elizabete. (2000), Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. Instituto de Química - UNICAMP (Divulgação) - Campinas, SP.
3. Lee, G.R., Bithell, T.( 1998). Hematologia Clínica. 1ª edição, editora Manole Ltda, São Paulo.
4. Lima, AO; Soares, J.B.; Creco, JB.; Galizzi, J. (2001), Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica, 8ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
5. Paschoal, AL; Crivelari, T; Canale, LCFC; Motheo, AJ; Leivas, TP. (2002), Análise de corrosão em aços inoxidáveis utilizados em implantes ortopédicos. In: Sulmat 2002 -Congresso em Ciência de Materiais do Mercosul, Joinville.
6. Ramos, AS.( 2001), Determinação da Seção Isotérmica a 1250°C e da Projeção Liquidus do Sistema Ti-Si-B na Região Delimitada por 100%Ti-80%Si-80%B, Tese de Doutorado, Programa de Engenharia de Materiais, DEMAR / FAENQUIL, Lorena.
7. Ravel, Richard. (1997), Laboratório Clínico: Aplicações dos Dados Laboratoriais, 6ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
8. Roitt, I, Brostoff, J., Male, D.( 2003), Imunologia. 6ª ed. Editora Manole Ltda. São Paulo SP.
9. Willians, DF; (1987), Definitions in Biomaterial. Progress in Biomedical Engineering; edElsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands.
10. Zago, M.A., Falcão, R.P., Pasquini, R. (2001), Hematologia: Fundamentos e Prática. Editora Atheneu, SP.

## **HEMOCOMPATIBILITY OF ALLOY CANDIDATE THE BIOMATERIAL: Ti-Si-B**

### **ABSTRACT**

*The occurrence of accidents from automachine vehicles, sport and also pathological processes (osteoporosis is an example) are increasing, provoking the use artificial materials to replace body parts injured. Material used whit this propose are called Biomaterials. In this area new investments and research has taken new biomaterial and also new alternatives of application bringing a bigger number of benefited people, mainly if results of these research are materials with accessible costs.*

*This work is based on evaluation of efficiency of a candidate to the biomaterial, the metallic alloy Ti-Si-B , when in direct contact whit the blood. Hemocompatibility tests is based in the international norms ISO 10993-4 Biological Evaluation of Medical Devices and ASTM 756 - Standard Practice will be Assessment of Hemolytic Proprieties of Material. Test "in vitro" will be performed. Results intend to show possible alterations in sanguineous components. This process has as purpose to be inquiring the possible application on the material for clinical use, as part of a series of biocompatibility studies that still to be carried through.*

**Keywords:** *Hemocompatibility, Metallic alloys, Biomaterial.*