



Efeito da morfologia de nanotubos de TiO₂ na viabilidade celular e estabilidade eletroquímica

Palavras-Chave: ligas de titânio, nanotubos de TiO₂, Anodização, Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e Viabilidade Celular.

Autores(as):

Mariana Ramos Luz, FCA – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Alessandra Cremasco (orientadora), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O desenvolvimento de biomateriais para implantes ósseos, dentários e em articulações com a função de auxiliar ou substituir tecidos, órgãos ou funções do corpo tem aumentado nos últimos anos em decorrência do aumento da expectativa de vida da população mundial. O titânio e suas ligas são os mais indicados para implante ósseo devido ao conjunto de propriedades que apresentam, tais como alta resistência específica, baixo módulo de elasticidade e excelente resistência à corrosão (MUMJITHA e RAJ, 2015)

A alta resistência à corrosão do titânio é devido a formação espontânea em sua superfície de um filme fino e passivo de TiO₂. No entanto, a deterioração deste filme pode ocasionar a corrosão do material e levar a liberação de íons tóxicos ao ser humano dependendo da composição química da liga. A liberação excessiva de íons impede a cicatrização do osso e tecidos, além de culminar com a falha mecânica no dispositivo (MUMJITHA e RAJ, 2015).

Com intuito de garantir maior qualidade e estabilidade do filme passivo na superfície do metal, a adição de elementos de liga como Zr, Nb e Ta permite aumentar a resistência à corrosão devido a formação de óxidos mais resistentes. Ainda, é possível aumentar a espessura deste filme óxido através de um processo eletroquímico denominado de anodização, podendo atingir espessura que varia de centenas de nanômetros (ALIPAL et al., 2021). O processo de anodização também leva ao crescimento de camadas auto-ordenadas de óxidos com diferentes morfologias (nanoporosas, ou nanotubulares) dependendo das condições operacionais do processo, tais como tempo de anodização, potencial aplicado, composição química e pH do eletrólito (LÓPEZ et al., 2016).

Os nanotubos quando produzidos tendem a apresentar arranjos amorfo, mas que cristalizam a anatase e/ou rutilo quando submetidos a um tratamento térmico em temperaturas entre 280 a 900 °C. Em geral, o processo para cristalização da camada nanoestruturada permite a modificação da fase polimórfica do TiO₂ sem alterar a morfologia e homogeneidade, porém resulta em alterações das dimensões dos tubos com nítido efeito nas propriedades superficiais (FATICHI et al., 2022). Segundo Faticchi et al (2022), superfícies de TiO₂ apresentando estrutura anatase tendem a ter maior viabilidade celular e maior adesão, assim como melhor estabilidade eletroquímica. No entanto, a literatura ainda é escassa de estudos que comprovem qual a melhor morfologia de nanotubos quanto ao comportamento biológico e de corrosão.

METODOLOGIA:

A preparação da liga Ti-35Nb-2Sn envolveu a fusão em forno à arco voltaico com eletrodo de W não consumido em atmosfera de argônio utilizando elementos Ti, Nb e Sn de alta pureza (99,99%) previamente decapados quimicamente. O lingote fundido foi homogeneizado à 1.000 °C por 12 h em atmosfera inerte e resfriado em água. Na sequência, foi realizada a deformação plástica por laminação com perfil cilíndrico à frio e após o seccionamento do mesmo em discos com 10 mm de diâmetro, foi realizado tratamento térmico de solubilização à 1.000 °C por 1 hora com resfriamento em água. A composição química da liga foi confirmada usando a técnica de espectrometria de fluorescência de raios X (XRF) em equipamento Shimadzu, modelo EDX7000.

A caracterização microestrutural das amostras envolveu análises de microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-X (DRX). As amostras foram previamente preparadas para metalografia mediante o lixamento com lixas de carvão de silício de granulometria #220 a #1500, seguido do polimento em feltros com abrasivo de diamante (6 μm) e lubrificação com álcool e polimento final com solução de sílica coloidal (0,04 μm) com adição de 40 mL H_2O_2 , 3 mL HNO_3 e 1,5 mL HF lubrificado com água. As amostras para análise por microscopia foram atacadas quimicamente em solução Kroll (3 mL HNO_3 , 1 mL HF, 96 mL H_2O) por aproximadamente 20 seg.

O processo de anodização foi executado em Potenciostato/Galvanostato Metrohm Autolab 302N utilizando potencial de 20 V e uma célula eletroquímica de dois eletrodos, sendo a amostra o anodo da célula e o catodo uma placa de platina estando ambas imersas no eletrólito. As amostras foram previamente lixadas e limpas em álcool isopropílico e água deionizada utilizando ultrassom por 10 min. Duas soluções eletrolíticas com diferentes tempos de anodização foram empregadas: solução aquosa de 0,3% (v/v) de ácido fluorídrico (HF) com tempo de anodização de 1 h e solução orgânica de 0,3% de fluoreto de amônia (NH_4F) com adição de 10% H_2O em etilenoglicol com tempo de anodização de 2 h. Após a anodização as amostras foram lavadas em água deionizada e secas com fluxo de N_2 . Para cristalização dos nanotubos formados nas superfícies das ligas Ti-35Nb-2Sn anodizadas nas duas diferentes soluções eletrolíticas, foi realizado tratamento térmico em forno mufla à 450 °C por 1 hora com taxa de aquecimento de 15 °C/min com resfriamento ao ar.

A camada de TiO_2 nanoestruturada e cristalina foi investigada por microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG) (FEI Sirion) o qual permitiu uma análise detalhada das características morfológicas do nanotubo, com a medição do diâmetro interno, externo, espessura e comprimento da camada com o auxílio do software ImageJ®. O diâmetro do nanotubo e a espessura da parede foram medidos a partir de imagens de vista superior, enquanto o comprimento da camada foi medido nas seções transversais. Enquanto que as fases estruturais do TiO_2 (anatase/rutilo) foram analisadas por difração de raios X (DRX) no modo de ângulo rasante em difratômetro PANalytical X-PERT Pro operando a 40kV e 30mA, com radiação $\text{CuK}\alpha = 0,15406$ nm, no intervalo angular de 20° a 60° e $\omega = 2^\circ$.

A molhabilidade da superfície da liga foi detectada a partir de medidas do ângulo de contato através do equipamento Dataphysics Contact Angle System OCA utilizando o método da gota sésil. Para cada amostra foram realizadas medidas em triplicata, utilizando um volume inicial da gota de água deionizada de 1 μL . A rugosidade RMS foi determinada usando um microscópio de força atômica (AFM, PARK NX10) atuando no modo intermitente em uma área de varredura de 10 x 10 μm associada ao uso do software de tratamento de dados Gywdition®.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em solução 0,9% NaCl à temperatura ambiente em uma célula eletroquímica de três eletrodos com uma placa de platina como contra-eletródo, um eletródo de Ag/AgCl como eletródo de referência e as amostras da liga Ti-35Nb-2Sn anodizadas como eletródo de trabalho. A área do eletródo de trabalho exposta ao eletrólito foi de 0,6 cm^2 e as análises foi precedida de 1 hora de estabilização em potencial de circuito aberto (OCP). Para avaliar a estabilidade eletroquímica foi realizada o ensaio de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) com uma amplitude de sinal senoidal de 10 mV ao longo de uma faixa de frequência de 10^4 Hz a 10^{-2} Hz, fazendo uso de um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT302N (Figura 3). Os circuitos equivalentes foram propostos e os dados obtidos foram ajustados por meio do software NOVA®.

Por fim, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT utilizando o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio fazendo uso de células mioblásticas C2C12. Após 48 h de cultivo celular, amostras das ligas Ti-35Nb-2Sn anodizadas e tratadas termicamente (previamente esterilizadas em autoclave) contendo as células C2C12 foram transferidos para uma placa de 24 poços, e realizada a adição de 200 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL diluído em PBS 1X) sendo incubadas a 37 °C por 2 horas. Após a remoção dessa solução, foram adicionados 400 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço de células tratadas para dissolver os cristais formados pelo MTT. A absorbância foi determinada a 570 nm utilizando um espectrofotômetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A composição química da liga foi determinada por espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) e obteve os seguintes valores em % em massa: $34,2 \pm 1,3$ de Nb e $2,0 \pm 0,1$ de Sn, os quais encontram-se próximos dos valores nominais da liga. A caracterização microestrutural realizada por microscopia óptica (Fig. 1a), microscopia eletrônica de varredura (Fig. 1b) e difração de raios-X (Fig. 1c) evidenciou a presença de fase β combinada com agulhas da fase martensítica ortorrômbica (α'').

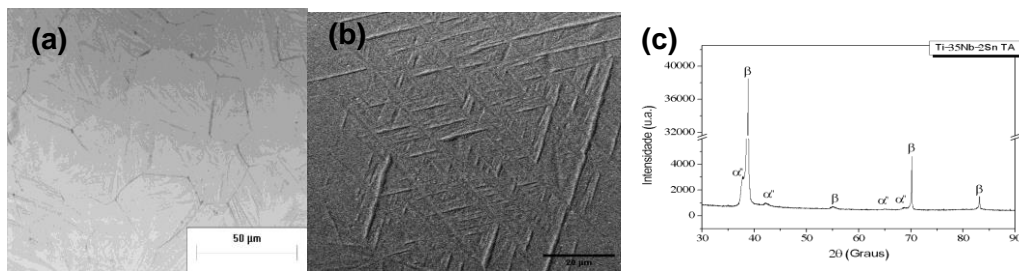


Figura 1: (a) Imagem de microscopia óptica (a), (b) imagem microscopia eletrônica e (c) Padrão de difração de raios-X da liga Ti-35Nb-2Sn na condição solubilizada e resfriada em água.

Anodização foi realizada a 20 V em solução 0,3% HF por 1 h e em solução 0,3% NH₄F com adição de 10% de H₂O em etilenoglicol por 2 h. A confirmação da formação dos nanotubos foi realizada por MEV-FEG. A Figura 2 (a-b) representa as vistas superiores e em corte transversal dos nanotubos de titânio (TiO₂) formados na superfície das ligas Ti-35Nb-2Sn por anodização utilizando as diferentes soluções eletrolíticas mencionadas. As vistas superiores mostram a formação da camada de óxido nanotubular contínua e altamente ordenada, com nanotubos abertos na parte superior e fechados na inferior.

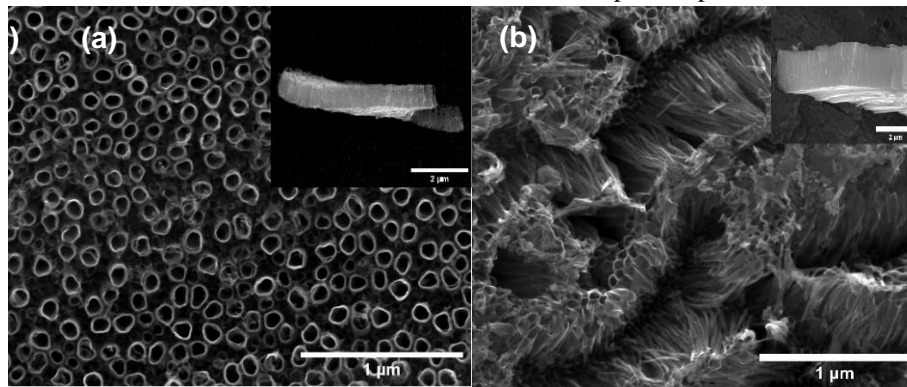


Figura 2: Imagens SEM-FEG mostrando vistas topográficas e transversais de camadas de TiO₂ NTs formadas por anodização a 20 V na superfície da liga Ti-35Nb-2Sn utilizando como eletrólito: a) aquoso 0,3% HF por 1 h e b) 0,3% NH₄F com 10% H₂O em etilenoglicol por 2 h.

A Tabela 1 evidencia os valores de diâmetros, espessuras de parede e comprimento dos nanotubos, onde é possível observar que os NTs produzidos em eletrólito aquoso apresentam maior diâmetro e inferior comprimento de camada. Estudos realizados por Wang et al. (2011) os quais comparam o comportamento biológico de NTs com diferentes diâmetros, 30, 70 e 100 nm, revelou que diâmetros de 70 nm apresentaram melhor osteocondutividade e osseointegração.

Dimensões do tubo (nm)	Ti-35Nb-2Sn-HF	Ti-35Nb-2Sn-NH ₄ F
Diam. Int.	17,464 ± 8,496	46,888 ± 15,426
Diam. Ext.	44,069 ± 8,089	53,923 ± 17,584
Espessura parede	26,605 ± 0,407	7,035 ± 2,158
Comprimento tubo	114,835 ± 12,027	121,984 ± 14,594

Tabela 1: Tabela de valores de diâmetros e comprimentos de nanotubos.

Os nanotubos produzidos na superfície da liga Ti-35Nb-2Sn por anodização em solução orgânica 0,3% NH₄F com adição de 10% H₂O em etilenoglicol e em solução aquosa 0,3% HF, ambos tratadas termicamente à 450 °C por 1 h, apresentaram cristalinidade conforme indica os padrões de difração de raios-X da Figura 3 (a-b), onde é possível constatar a fase anatase (A) do TiO₂ combinado com a fase Ti-β proveniente do substrato.

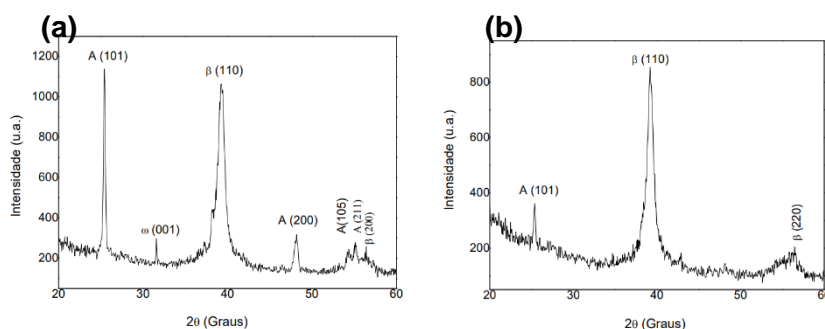


Figura 3: Padrão de difração de raios-X da superfície da liga Ti-35Nb-2Sn anodizada a 20 V em solução a) 0,3% NH₄F + 10% H₂O em etilenoglicol por 2 h e b) 0,3% HF por 1 h e tratadas termicamente à 450 °C por 1 h.

As propriedades físico-químicas das superfícies produzidas por anodização em duas diferentes soluções eletrolíticas foram analisadas. A análise de ângulo de contato (Figura 7a-b) revelou para ambos os casos superfícies hidrofílicas (ângulo de contato inferior a 90°), sendo levemente inferior para os NTs de maior dimensão, ou seja, aqueles produzidos em eletrólito aquoso. Segundo Su *et al.* (2018) nanotubos com diâmetros maiores têm maior molhabilidade, sendo este um fator relevante para melhorar a biocompatibilidade.

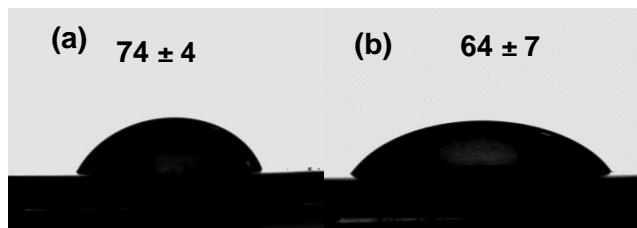


Figura 7: Imagem de microscopia óptica mostrando o aspecto da gota e o correspondente ângulo de contato formado para a superfície da liga Ti-35Nb-2Sn anodizada a 20 V em solução (a) 0,3% NH_4F + 10% H_2O em etilenoglicol por 2 h e (b) 0,3% HF por 1 h e tratadas termicamente à 450°C por 1 h.

Os valores de rugosidade RMS foram obtidos para ambas as superfícies anodizadas, sendo que para as superfícies cujos nanotubos foram produzidos em eletrólito orgânico ($\text{NH}_4\text{F}/\text{H}_2\text{O}/\text{Etilenoglicol}$) a rugosidade foi maior ($237 \pm 1 \mu\text{m}$) quando comparado a superfície apresentando nanotubos que foram produzidos em eletrólito aquoso (HF/ H_2O) ($84 \pm 1 \mu\text{m}$). Os parâmetros dimensionais do nanotubo, como comprimento, diâmetro e espessura da parede, também influenciam na rugosidade da superfície. Segundo estudos conduzidos por Galstyan *et al.* (2012) a rugosidade aumenta linearmente com o comprimento do tubo, enquanto Yu *et al.* (2010) tem observado que a rugosidade aumenta com o diâmetro do nanotubo. A Figura 8 mostra as imagens de AFM de ambas as superfícies, a qual mostra nitidamente o aspecto rugoso da superfície nanoestruturada produzida em eletrólito orgânico.

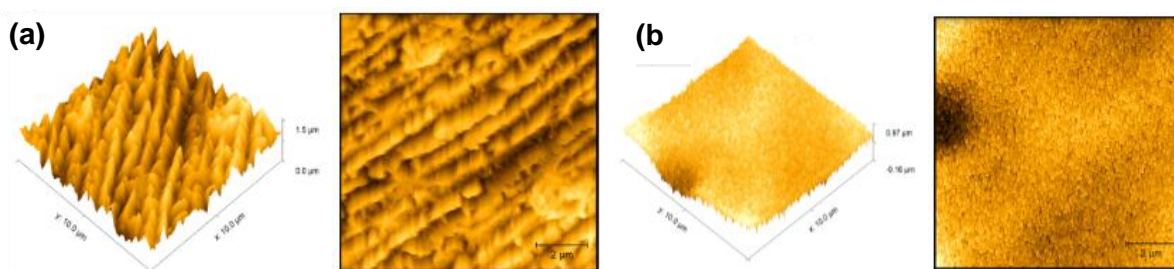


Figura 8: Imagens de AFM (3D-esquerda e 2D-direita) da superfície da liga Ti-35Nb-2Sn contendo nanotubos de TiO_2 formados em eletrólito: (a) 0,3% NH_4F + 10% H_2O em etilenoglicol por 2 h e (b) 0,3% HF por 1 h e tratadas termicamente à 450°C por 1 h.

A análise da estabilidade eletroquímica da camada nanoestruturada produzida em eletrólito aquoso (0,3% HF) e orgânico (0,3% $\text{NH}_4\text{F}/10\% \text{H}_2\text{O}/\text{Etilenoglicol}$) foi realizada por EIE em solução 0,9% NaCl após 1 h de estabilização em circuito aberto. Os resultados alcançados nos ensaios de EIE mostraram que as superfícies nanoestruturadas apresentam módulos de impedância na ordem de $10^{-5} \Omega$ (Fig. 9a), sendo levemente superior para os nanotubos produzidos utilizando eletrólito orgânico. A análise do gráfico de Bode-fase (Fig. 9b) indicou ângulo de fase próximo a 80° na região de baixa frequência e a presença de duas constantes de tempo para ambas as superfícies analisadas o que são indicativo do comportamento capacitivo do filme produzido na superfície das ligas.

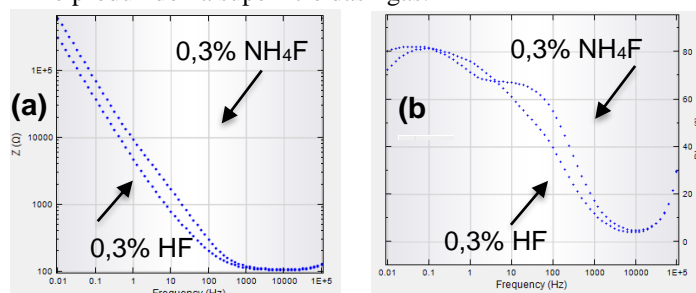


Figura 9: (a) Gráficos de Bode e (b) Gráfico de Bode-Fase resultante dos ensaios de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica realizadas para a liga Ti-35Nb-2Sn contendo nanotubos de TiO_2 formados em eletrólito 0,3% NH_4F + 10% H_2O em etilenoglicol por 2 h e em eletrólito 0,3% HF por 1 h e tratadas termicamente à 450°C por 1 h.

A análise dos dados de impedância indicou que o circuito equivalente é composta pelos elementos QBL e RBL em paralelo, atribuídos ao elemento de fase constante da camada de óxido de barreira e à resistência da camada correspondente,

que são indicativos do filme compacto e nativo formado na superfície da liga, combinado com os elementos RPL e QPL em série, os quais são atribuídos a camada nanoestruturada e porosa. Esse circuito, mostrado na Figura 10, foi inicialmente proposto por Hitzig *et al.* (1986) para investigar um filme de óxido de duas camadas formado sobre alumínio, e posteriormente, empregado por Pan *et al.* (1996) para descrever o filme de óxido passivo formado em titânio em solução salina. Os parâmetros eletroquímicos obtidos pelo ajuste do circuito equivalente proposto estão mostrados na Tabela 2.

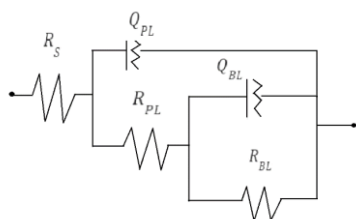


Figura 10: Circuito equivalente utilizado nos ajustes dos dados de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

Eletrólito	Rs (Ω)	RBL (kΩ)	QBL (μF)	n	RPL (MΩ)	QPL (μF)	n
0,3% NH ₄ F/10% H ₂ O/ etilenoglicol	107,5	14200	0,0000157	0,8635	5,18E+06	6,10E-06	1,02
0,3% HF	111	968	2,16E-05	0,891	1,10E+12	1,86E-05	0,907

Tabela 2: Parâmetros eletroquímicos obtidos pelo ajuste do circuito equivalente com os dados de espectroscopia de impedância eletroquímica realizada em solução 0,9% NaCl das superfícies da liga Ti-35Nb-2Sn anodizadas em eletrólito orgânico e aquoso e tratadas termicamente a 450 °C por 1h.

As ligas Ti-35Nb-2Sn anodizadas em eletrólito aquoso (0,3% HF) e orgânico (0,3% NH₄F/10% H₂O/Etilenoglicol) foram submetidas a ensaios biológicos de proliferação celular utilizando-se células C2C12 as quais indicaram superior resposta celular quando estas são comparada a similar liga apresentando superfície polida.

CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a liga Ti-35Nb-2Sn apresenta microestrutura formada majoritariamente da fase β. A anodização realizada em solução orgânica (0,3% de NH₄F) resultou em menor diâmetro de tubo e superior espessura de camada quando comparada à amostra anodizada em solução aquosa (0,3% de HF). Essa morfologia nanoestruturada resultou em superior molhabilidade e rugosidade RMS, assim como maior resistência do filme passivo. Os ensaios biológicos realizados nas ligas anodizadas nos diferentes eletrólitos (orgânico e aquoso) mostrou-se sensível às diferentes morfologias e dimensões de tubos.

BIBLIOGRAFIA

- Alipal, J.; Lee, T.C.; Koshy, P.; Abdullah, H.Z.; Idris, M.I. Evolution of anodised titanium for implant applications. Vol. 7. Heliyon, 2021.
- D.M.D. Ehrenfest, P.G. Coelho, B. Kang, Y. Sul, T. Albrektsson, Classification of osseointegrated implant surfaces : materials , chemistry and topography, Trends Biotechnol. 28 (2010) 198–206, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.003>.
- E.P. Su, D.F. Justin, C.R. Pratt, V.K. Sarin, Effects of titanium nanotubes on the osseointegration , cell differentiation , mineralisation and antibacterial properties of orthopaedic implant surfaces, Bone Joint Lett. J 100 (2018) 9–16, <https://doi.org/10.1302/0301-620X.100B1.BJJ-2017-0551.R1>.
- Fatichi, A. Z; Mello, M. G.; Pereira, K. D.; Antonio, L. G. M.; Luchessi, A. D.; Caram, R.; Cremasco, A. Crystalline phase of TiO₂ nanotube arrays on Ti–35Nb–4Zr alloy: Surface roughness, electrochemical behavior and cellular response. Ceramics International, v. 48, p. 5154–5161, 2022.
- Hernández-López, J.M.; Conde A.; Damborenea, J.J; Arenas, M. A. Electrochemical response of TiO₂ anodic layers fabricated on Ti6Al4V alloy with nanoporous, dual and nanotubular morphology. Corrosion Science, v. 112, p. 194-203, 2016.
- Hitzig J, Jüttner K, Lorenz WJ, Paatsch W (1986) AC-impedance measurements on corroded porous aluminum oxide films. J Elec- trochem Soc 133(5):887–892
- Mumjitha, M.; Raj, V. Fabrication of TiO₂–SiO₂ bioceramic coatings on Ti alloy and its synergetic effect on biocompatibility and corrosion resistance. Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 46, p. 205-221, 2015.
- N. Wang, H. Li, W. Lü, J. Li, J. Wang, Z. Zhang, Y. Liu, Effects of TiO₂ nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs, Biomaterials 32 (2011) 6900–6911, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.023>.
- Pan J, Thierry D, Leygraf C (1996) Electrochemical impedance spectroscopy study of the passive oxide film on titanium for implant application. Electrochim Acta 41(7–8):1143–1153
- V. Galstyan, E. Comini, A. Vomiero, A. Ponzoni, I. Concina, M. Brisotto, E. Bontempi, G. Faglia, G. Sberveglieri, Fabrication of pure and Nb-TiO₂ nanotubes and their functional properties, J. Alloys Compd. 536 (2012) S488–S490, <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2011.12.076>.
- W.Q. Yu, X.Q. Jiang, F.Q. Zhang, L. Xu, The effect of anatase TiO₂ nanotube layers on MC3T3-E1 preosteoblast adhesion, proliferation, and differentiation, J. Biomed. Mater. Res. A. 94 (2010) 1012–1022, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32687>.