

## BIOATIVIDADE DE FILMES HÍBRIDOS DE CARBONO TIPO-DIAMANTE CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE TiO<sub>2</sub>

F. S. Lopes<sup>1\*</sup>, C. A. G. S. Oliveira<sup>1</sup>, N. C. S. Leite<sup>1</sup>, V. J. Trava-Airoldi<sup>2</sup>, A. O. Lobo<sup>1</sup>, F. R. Marciano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Laboratório de Nanotecnologia (NANO BIO), Av. Shishima Hifumi 2911, São José dos Campos, 12244-000, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS), Av. dos Astronautas 1758, São José dos Campos, 12227-010, SP, Brasil.

E-mail: [nutricao-lobes@bol.com.br](mailto:nutricao-lobes@bol.com.br)

**Resumo:** O estudo em filmes de carbono tipo-diamante (DLC) para aplicações biomédicas tem sido ativamente estudado devido às suas características físicas, químicas e biológicas, apresentando boa interação com o meio biológico e efeitos bactericidas. O objetivo deste trabalho foi comparar a resposta de bioatividade do aço 316L revestido por DLC e DLC contendo nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) incorporadas. O processo de biomineralização foi realizado pela imersão em solução semelhante ao fluido corporal acelular (SBF). Para caracterização foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV), difratografia de raios-X (DRX) e análise de alterações químicas da solução por análise de pH. Os resultados apresentados demonstram a bioatividade dos grupos e presença de apatitas carbonatadas na superfície do material variando de acordo com a inserção das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> no DLC. Desta forma, estes filmes apresentam-se bioativos e uma alternativa para revestimentos de aços 316L aplicados como de implantes.

**Palavras-chave:** Bioatividade; carbono tipo-diamante; nanopartículas; dióxido de titânio.

**Abstract:** The study on diamond-like carbon films (DLC) for biomedical applications has been studied because of their physical, chemical and biological characteristics, showing good interaction with middle and antibacterial effects. This study compares the bioactivity of stainless steel 316L uncoated and coated with DLC and TiO<sub>2</sub>-DLC films. The biomineralization was performed by immersion in simulated body fluid (SBF). Scanning electron microscopy (SEM), X-Ray Diffraction (DRX) and analysis of chemical changes of the solution (pH) characterized the different samples. The results demonstrate the bioactivity of the groups and the presence of carbonated apatite on the surface varying the TiO<sub>2</sub> nanoparticles. In this way, these films are an alternative to bioactive coatings for 316L stainless steel applied as implant coating.

**Keywords:** Bioactivity, diamond-like carbon; nanoparticles; titanium dioxide.

### Introdução

Biomateriais são materiais orgânicos ou inorgânicos

com características biocompatíveis com o organismo vivo. São utilizados para reparar e restabelecer a funcionalidade do tecido, contudo evitando respostas biológicas adversas locais ou sistêmicas, sendo assim bioativos [1-3].

Filmes de carbono tipo diamante (*Diamond-like carbon*, DLC), vem sendo empregados no revestimento de materiais metálicos devido às suas características, como elevada dureza mecânica, baixo coeficiente de atrito, ação bactericida e facilidade de deposição em diferentes substratos metálicos [4-10].

Essas características dos filmes podem ser melhoradas quando nanopartículas são inseridas em sua estrutura. Em especial, quando as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) são incorporadas diretamente na estrutura do material, formando um revestimento híbrido [4-10].

Entretanto, para expressar a bioatividade dos materiais, testes *in vitro* utilizando o fluido corporal acelular (*simulated body fluid*, SBF) são necessários a fim de se avaliar a formação de camada de apatitas na superfície das amostras [9,11,12]. O objetivo desse trabalho é avaliar a bioatividade e a biomineralização de filmes de DLC contendo nanopartículas de TiO<sub>2</sub> em diferentes concentrações.

### Materiais e métodos

Os substratos (discos com espessura de 1 mm e diâmetro de 4,6 mm) utilizados para a realização dos experimentos neste trabalho foram amostras de aço inoxidável 316L. Esses substratos foram submetidos a alguns processos de limpeza, responsáveis pela total remoção de impurezas que possam vir a comprometer a aderência dos filmes de DLC à sua superfície. Inicialmente, os substratos metálicos de aço inox foram limpos, em banho de acetona PA, sonificados por 5 minutos, e secos utilizando um jato de nitrogênio super seco.

A deposição dos filmes finos de DLC foi realizada pela técnica de deposição química da fase vapor assistida por plasma (*plasma enhanced chemical vapor deposition*, PECVD) [9]. A sequência de gases injetados no interior da câmara pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência de gases injetados no processo de deposição dos filmes finos de DLC.

Elemento	Fluxo (sccm)	Pressão (mTorr)	Tensão (V)	Tempo (min)
Argônio	1	8,0	-700	20
Silano	1	8,0	-700	20
Metano	1	8,0	-400	20

Após essas etapas do processo, a deposição do DLC foi realizada a partir do hexano ( $C_6H_{14}$ ) como fonte de carbono, durante um tempo pré-estabelecido de 1 hora com uma tensão de autopolarização de -700 V, até que fosse atingida a espessura aproximada de 2,0  $\mu m$ . Para a produção dos filmes de DLC contendo nanopartículas de dióxido de titânio ( $TiO_2$ -DLC) incorporadas, nanopartículas de  $TiO_2$  (Aeroxide<sup>®</sup> P25, Evonik) com cerca de ~21 nm de diâmetro foram dispersas em hexano em diferentes concentrações (0,1; 0,3 e 0,5 g/L). Essas dispersões substituíram o hexano na produção dos filmes de  $TiO_2$ -DLC em diferentes concentrações.

Para o teste de bioatividade foi utilizada solução de SBF, que simula o líquido corporal acelular [11]. Todas as amostras foram separadas de acordo com o grupo, sendo 3 amostras por grupo. Todos os grupos permaneceram imersas por 21 dias em SBF (20 mL/amostra) em recipiente de polipropileno graduado mantido sobre agitação constante de 75 RPM (Incubadora Refrigerada Shaker CT713). A medida do pH da solução foi realizada utilizando um peagâmetro de bancada (Metrohm 827 pH Lab). A análise morfológica dos cristais utilizou o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Zeiss EVO MA 10). O tamanho e a orientação dos cristais utilizaram a difratometria de Raios-X (DRX, Philips X'Pert MRD).

## Resultados

O controle da temperatura e pH da solução são de grande importância para os resultados, visto que simulam o processo fisiológico [13]. A Tabela 2 apresenta as médias das medidas de pH das soluções de SBF, onde estavam imersos os diferentes grupos de amostras. Com o passar dos dias, observou-se um aumento do pH da solução em todos os grupos de amostras. O maior valor de pH foi encontrado na solução que continha amostras de  $TiO_2$ -DLC (0,5 g/L). Acredita-se que o aumento do pH possa melhorar a nucleação e formação de apatitas [14].

A Figura 1 mostra a análise morfológica da superfície das amostras por meio do MEV. As micrografias apresentam a formação de apatitas e aglomerados por toda a extensão dos filmes em todos os grupos. Contudo, nas amostras de  $TiO_2$ -DLC (0,3 g/L), Figura 1c, houve uma maior presença de aglomerados de cristais comparados aos demais grupos como observados.

Tabela 2. Valores médios das medidas de pH das soluções de SBF em cada grupo de amostras. O desvio padrão corresponde à amostragem feita em 3 alíquotas diferentes.

Amostra	Dias			
	1	2	4	21
Aço	8,09	8,08	8,17	8,37
inoxidável	$\pm 0,19$	$\pm 0,13$	$\pm 0,26$	$\pm 0,16$
DLC	8,09	8,12	8,33	8,45
	$\pm 0,21$	$\pm 0,19$	$\pm 0,13$	$\pm 0,09$
$TiO_2$ -DLC	8,20	8,20	8,40	8,39
0,1 g/L	$\pm 0,17$	$\pm 0,16$	$\pm 0,07$	$\pm 0,11$
$TiO_2$ -DLC	8,22	8,20	8,43	8,43
0,3 g/L	$\pm 0,16$	$\pm 0,13$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$
$TiO_2$ -DLC	8,24	8,24	8,42	8,5
0,5 g/L	$\pm 0,07$	$\pm 0,07$	$\pm 0,06$	$\pm 0,04$

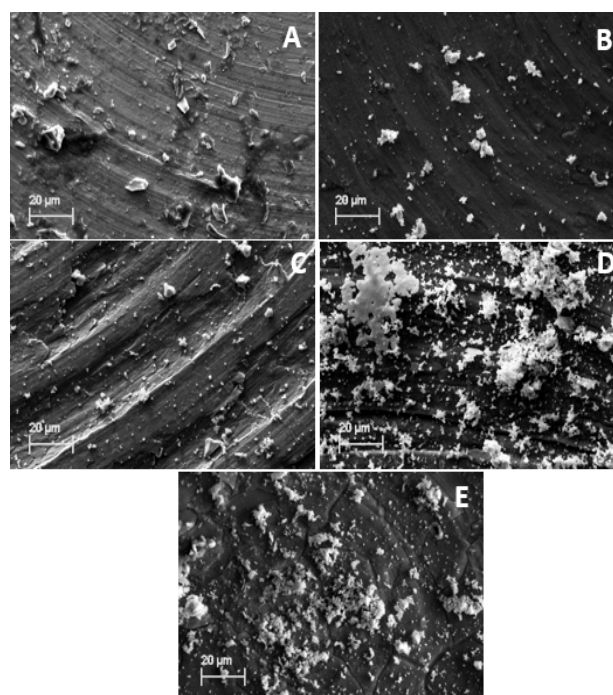


Figura 1. Micrografias das superfícies das amostras de (A) Aço inoxidável 316L; (B) DLC; (C)  $TiO_2$  0,1g/L-DLC; (D)  $TiO_2$  0,3g/L-DLC; (E)  $TiO_2$  0,5g/L-DLC

A Figura 3 apresenta os difratogramas dos cristais formados nas amostras após 21 dias de imersão em SBF. Através dos difratogramas, é possível afirmar que os cristais formados nas superfícies das amostras são de apatita carbonatada, segundo a ficha cristalográfica indexada no *Joint Comitee of Powder Diffraction Standards*, JCPDS 00-004-0697 as fichas JCPDS 00-003-1044 e JCPDS 00-033-0397 representam os cristais referente ao substrato da amostra. A análise de difratometria foi importante para identificar os cristais na superfície das amostras, comprovando que após 21 dias as amostras foram biomineralizadas (formação de apatita carbonatada).

Após a identificação dos picos, o tamanho dos cristalitos foi calculado através da Equação de Scherrer (figura 2) [14], conforme mostrado na Tabela 3.

Observou-se que o grupo TiO<sub>2</sub>-DLC (0,3 g/L) apresentou menor valor comparado com os demais grupos testados.

$$\beta s(2\theta)_{hkl} = \frac{K \lambda}{T \cos \theta_{hkl}}$$

Figura 2: Equação de Scherrer.

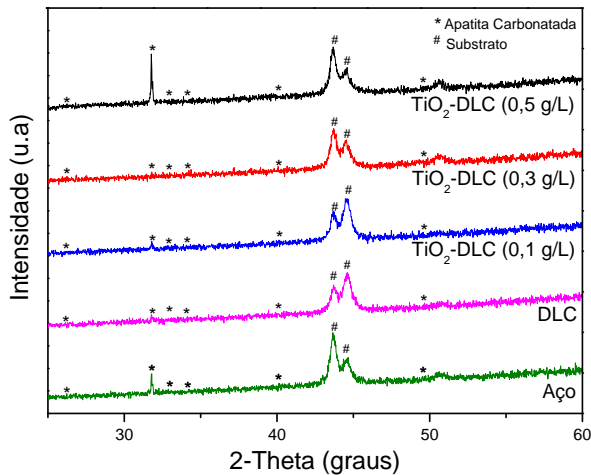


Figura 3: Difratoograma de raios-X das amostras após a imersão durante 21 dias em solução de SBF. O (\*) representa a identificação da apatita carbonatada segundo JCPDS 00-004-0697 e (#) identifica cristais do substrato das amostras JCPDS 00-003-1044 e JCPDS 00-033-0397.

Tabela 3: Tamanho dos cristalitos (calculado através da Equação de Scherrer) presentes em cada grupo de amostras.

Amostra	Tamanho do cristalito (nm)
Aço	164,5
DLC	36,6
TiO <sub>2</sub> -DLC (0,1 g/L)	41,1
TiO <sub>2</sub> -DLC (0,3 g/L)	13,1
TiO <sub>2</sub> -DLC (0,5 g/L)	82,3

## Discussão

O ensaio de bioatividade, pode ser avaliado por meio do comportamento do pH da solução. A Tabela 2 mostra que todos os grupos interagiram com a solução indicando a bioatividade dos materiais através do aumento do pH [15]. Esse mesmo resultado foi confirmado nas micrografias (Figura 1) onde se observa a deposição dos cristais de apatitas carbonatadas como identificado pelos difratogramas (Figura 3).

Segundo Zhang et al. [16], ao realizar a comparação da variação pH com tamanho da partícula em 3 tipos de vidro por imersão em SBF, observou-se que o pH das soluções apresentaram maiores valores nos tempos iniciais e observaram que o tamanho médio da partícula diminuiu com o aumento do pH. No presente estudo, comportamento semelhante foi observado para o grupo do aço 316L, onde houve um aumento do cristalito com

menor valor de pH. Contudo, para o grupo TiO<sub>2</sub>-DLC (0,3 g/L) que apresentou o valor do pH ligeiramente aumentado comparado ao anterior, o mesmo apresentou menor tamanho do cristalito (Tabela 3) [16].

Segundo Neves et al. [17], as apatitas carbonatadas tipo B, obtidas por solução aquosa em temperaturas baixas (37 a 100°C) por precipitação, apresentam características minerais semelhantes às dos dentes e ossos, baixa cristalinidade e redução do tamanho médio do cristalito [17]. Essas características foram observadas para o grupo TiO<sub>2</sub>-DLC (0,3 g/L).

Para aplicações biológicas, sugere-se que um aumento do tamanho médio do cristalito da hidroxiapatita aumente proporcionalmente ao tempo de biomineralização, reduzindo a característica de cristalinidade dos cristais de carbonato. Estes beneficiam o comportamento para células precursoras de osteoblastos em termos de adesão celular [18-19]. As amostras do grupo TiO<sub>2</sub>-DLC (0,3 g/L) apresentam menor cristalito, conforme visto na Figura 1, maior área de deposição de cristais (Tabela 3), sendo assim sugerindo a um grande potencial em aplicações biomédicas.

## Conclusão

Neste trabalho foi analisada a bioatividade de filmes de DLC contendo nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Observou-se que o pH da solução aumenta de acordo com o aumento da concentração das nanopartículas no filme. Em todos os difratogramas foram identificados picos característicos de apatita carbonatada, independente da amostra. Nas micrografias, o grupo TiO<sub>2</sub>-DLC (0,3 g/L) apresentou a maior homogeneidade de cristais e menor tamanho médio do cristalito. Estes resultados demonstram um grande potencial do uso de revestimentos de DLC contendo nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2011/20345-7 e 2011/17877-7) e a Fundação Valeparaibana de Ensino pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] Oréface RL, Pereira MM, Mansur HS. Biomaterias Fundamentos & Aplicações. 1ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- [2] Cheng HC, Chiouc SY, Liue CM, Ling MH, Chena CC, Oui KL. Effect of plasma energy on enhancing biocompatibility and hemocompatibility of diamond-like carbon film with various titanium concentrations. Journal of Alloys and Compounds. 2009; 477 (2009):931–935. Doi: 10.1016/j.jallcom.2008.11.043
- [3] Bauer S, Schmukia P, Mark KVD, Park J. Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. Progress in Materials Science. 2013;

- 58(2013):261–326. Doi: 10.1016/j.pmatsci.2012.09.001
- [4] Hauert R. A review of modified DLC coatings for biological applications. *Diamond and Related Materials*. 2003; 12(2003):583–589. Doi: 10.1016/S0925-9635(03)00081-5
- [5] Smietana M, Szmidi J, Dudek M, Niedzielski P. Optical properties of diamond-like cladding for optical fibres. *Diamond and Related Materials*. 2004; 13(2004):954–957. Doi: 10.1016/j.diamond.2003.12.003
- [6] Lin CM, Yen SK. Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO<sub>2</sub> coatings in simulated body fluid. *Materials Science and Engineering*. 2006; 26(2006):54–64. Doi: 10.1016/j.msec.2005.06.048
- [7] Shtansky DV, Gloushankova NA, Bashkova IA, Kharitonova MA, Moizhess TG, Sheveiko AN, Kiryukhantsev-Korneeva FV, Petrzhika EA, Levashov EA. Multifunctional Ti-(Ca,Zr)-(C,N,O,P) films for load-bearing implants. *Biomaterials*. 2006; 27(19):3519–31. Doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.012
- [8] Marciano FR, Bonetti LF, Da-Silva NS, Corata EJ, Trava-Airoldi VJ. Diamond-like carbon films produced from high deposition rates exhibit antibacterial activity. *Synthetic Metals*. 2009; 159(2009):2167–2169. Doi: 10.1016/j.synthmet.2009.07.050
- [9] Amin MS, Randeniya LK, Bendavid A, Martin PJ, Preston EW. Amorphous carbonated apatite formation on diamond-like carbon containing titanium oxide. *Diamond and Related Materials*. 2012; 18(9):1139–1144. Doi:10.1016/j.diamond.2009.02.034
- [10] Almeida CN, Ramos BC, Silva NS, Soares CP, Trava-Airoldi, Lobo AO, Marciano FR. Morphological analysis and cell viability on diamond-like carbon films containing nanocrystalline diamond particles. *Applied Surface Science*. 2013; 275(2013):258–263. Doi: 10.1016/j.apsusc.2012.12.122
- [11] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006; 27(15):2907–15. Doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017
- [12] Marsi TCO. Biomíneralização de nanotubos de carbono alinhados verticalmente superhidrofílicos. [Dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2012.
- [13] Zadpoor AA. Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials. *Materials Science and Engineering*. 2014; 35(2014):134–143.
- [14] Burton AW, Ong K, Rea T, Chan IY. On the estimation of average crystallite size of zeolites from the Scherrer equation: A critical evaluation of its application to zeolites with one-dimensional pore systems. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009; 117(2009):75–90.
- [15] Pan H, Zhao X, Darvell BW, Lua WW. Apatite-formation ability – Predictor of “bioactivity”? *Acta Biomaterialia*. 2010; 6(2010):4181–4188.
- [16] Campos SD, Campos EA, Alex W, Favreto J, Carneiro LB, Pazinato J. Estudo da bioatividade de materiais constituídos óxidos de zircônio e de titânio. *Orbital Electronic Journal of Chemistry*. 2011; 3(4):180–197.
- [17] Zhang D, Hupa M, Hupa L. In situ pH within particle beds of bioactive glasses. *Acta Biomaterialia*. 2008; 4(5):1498–505. doi:10.1016/j.actbio.2008.04.007
- [18] Neves MF. Análise da biomíneralização e proliferação celular in vitro de scaffolds de hidroxiapatita/nanotubos de carbono superhidrofílicos verticalmente alinhados com paredes múltiplas. [Dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2013.
- [19] Inacio JPM, Brazil TR. Biomíneralização in vitro de compósitos de hidroxiapatita e nanotubos de carbono utilizando fluido corporal simulado. [trabalho de conclusão de curso]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2013.