

## **AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DOS HIDRETOS DE Ti, Nb e Zr**

T.S. Goia, H. Takiishi, A.T. Rodas, O.Z. Higa, J.C. Bressiani, A.H.A. Bressiani  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 CEP: 05508-000 São Paulo – Brasil  
e-mail: tsgoia@ipen.br  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

### **RESUMO**

*Biomateriais são bastante requisitados na medicina atual, substituindo ou promovendo reparação de tecidos ou órgãos. No campo dos biomateriais metálicos, existem inúmeras possibilidades na utilização de ligas biomédicas, sendo que o titânio comercialmente puro (Ticp) tem comprovadamente excelentes características de biocompatibilidade. Neste trabalho foi avaliada a citotoxicidade, em teste in vitro, dos hidretos utilizados para obtenção da liga Ti-13Nb-13Zr; da liga após sinterização e peças de Ticp. Os materiais testados foram mantidos em contato com um meio de cultura por 48 horas, em estufa a 37°C e atmosfera úmida (5% CO<sub>2</sub>). O extrato diluído foi submetido a um corante supravital do composto tetrazólico (MTS) e um agente aclopador de elétrons (PMS). Após o período de incubação, foi verificada, por análise espectrofotométrica, a quantidade de células sobreviventes no meio de cultura. Os resultados comprovam que os meios dos hidretos obtidos pelo processo de hidrogenação-desidrogenação, e a liga sinterizada não são citotóxicos.*

Palavras-chave: ligas de titânio, hidretos metálicos, metalurgia do pó, citotoxicidade.

### **INTRODUÇÃO**

Na medicina, os biomateriais vêm proporcionando a melhoria na qualidade de vida de muitas pessoas que necessitam reparar ou substituir órgãos ou tecidos.

Biomateriais metálicos, como aço inox AISI 316L e ligas de Co-Cr, são bastante utilizados para confecção de próteses ortopédicas e implantes em geral. Porém, as ligas à base de titânio são as mais indicadas para essas finalidades. Das características das ligas de titânio, as principais são biocompatibilidade e resistência à corrosão, que favorecem a utilização em diversas áreas, assim como em odontologia. Para o processo de reabilitação oral, titânio comercialmente puro (Ticp), e ligas, como Ti-6Al-7Nb e Ti-6Al-4V, estão sendo utilizadas <sup>(1)</sup>.

A escolha da liga depende muito de suas indicações. Ligas do tipo Ti-6Al-4V apresentam em sua composição o alumínio e vanádio que são citotóxicos quando liberados na forma de íons em ensaios de desgaste em meio fisiológico <sup>(2,3)</sup>. Não somente as características de toxicidade devem ser levadas em consideração, o caráter biomecânico também deve ser analisado na escolha da liga. O módulo de elasticidade de um implante endosseio, por exemplo, deve ser bem próximo ao do osso, já que a distribuição de tensões nos tecidos adjacentes pode ser determinante para o sucesso esperado <sup>(4)</sup>.

A liga Ti-13Nb-13Zr tem sido pesquisada por apresentar todos seus componentes biocompatíveis e possuir propriedades físicas, mecânicas e biológicas favoráveis aos processos de reabilitações com implantes. Além de ser considerada totalmente biocompatível, a liga apresenta baixo módulo de elasticidade, elevados valores de resistência mecânica e à corrosão <sup>(1, 5)</sup>.

A obtenção de ligas de titânio pelo processo de metalurgia do pó (M/P) mostrou-se como uma alternativa em virtude das características que a técnica propicia. Uma característica que pode ser importante é a formação de porosidade na superfície da peça final, otimizando o processo de osteointegração entre o material e o osso <sup>(6)</sup>. Para a utilização do processo de M/P, são necessárias modificações nas propriedades físicas e mecânicas dos pós para diminuir a resistência elástica do material, permitindo a fragilização do mesmo e agilizar a etapa de moagem <sup>(5)</sup>.

A utilização do processo de hidrogenação-desidrogenação (HDH) permite obter os pós metálicos componentes da liga com as características desejadas. Em muitos metais, o hidrogênio é capaz de ocupar espaços intersticiais a uma determinada temperatura e pressão. Dissolvido nos interstícios, o hidrogênio expande as estruturas cristalinas, deslocando os átomos e causando uma distorção da ordem de até 20%. Titânio, nióbio e zircônio são capazes de absorver o hidrogênio em suas estruturas, viabilizando a utilização desta técnica <sup>(7,8)</sup>.

Durante o processo de obtenção dos hidretos e da liga, podem ser utilizadas substâncias deletérias ao organismo. Para analisar os materiais nas diversas etapas do processo foi analisada a citotoxicidade dos hidretos de titânio (TiH<sub>2</sub>), nióbio (NbH) e zircônio (ZrH<sub>2</sub>) e da amostra sinterizada da liga, utilizando para comparação titânio comercialmente puro (Ticp).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção dos hidretos

Para a obtenção dos pós de titânio (Ti), nióbio (Nb) e zircônio (Zr), os materiais em sua forma inicial foram submetidos ao processo de hidrogenação. Em forno a vácuo (10<sup>-2</sup> µBar), e sob temperaturas elevadas, cada material teve um patamar de uma hora para poder absorver hidrogênio nos interstícios da rede cristalina (Tabela 1).

Tabela 1 Temperatura do patamar para hidrogenação.

Material	Ti	Nb	Zr
Temperatura (°C)	600	600	500

Após o resfriamento do forno, o material, já apresentando características de fragilidade, foi quebrado em um pilão revestido com aço inox; foram selecionadas as partículas que passaram por peneira de malha 20.

Os materiais passaram por um processo de decapagem em solução de 100ml de água destilada e 10ml de ácido nítrico, após o quê foram feitas sucessivas lavagens com água destilada, até que o pH da água estivesse neutro. Após a secagem dos pós em estufa, estes foram pesados em balança analítica na estequiometria da liga e colocados em moinho com bolas de tungstênio para a etapa da moagem. O meio líquido utilizado para otimizar o processo foi ciclohexano (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>). A moagem foi realizada em moinho do tipo Planetário de alta energia, com velocidade de 300rpm, por 90 minutos. Após a moagem, o ciclohexano foi removido em vácuo. A caracterização do pó da liga foi feita por: espectrometria de fluorescência de raios-X (EDXRF), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios X (DRX).

O pó foi submetido à prensagem isostática a frio em molde de silicone, com pressão de 200 MPa. As amostras, em cadinho de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e tubo de quartzo foram sinterizadas a  $1150^\circ\text{C}$  por 5 horas e  $10^{-5}$   $\mu\text{Bar}$ . A caracterização foi feita por MEV, espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e DRX.

### Ensaio de citotoxicidade

Os pós, em sua forma hidretada ( $\text{TiH}_2$ ,  $\text{NbH}$ ,  $\text{ZrH}_2$ ), a mistura com a composição desejada da liga e a amostra sinterizada foram testados, em relação a citotoxicidade, seguindo as normas da ISO-10993-5 (1993). Foi utilizado titânio comercialmente puro (Ticp), como controle negativo, e solução fenol com concentração de 0,3%, como controle positivo. Os pós foram autoclavados e acondicionados cuidadosamente para evitar possíveis contaminações cruzadas. As amostras foram colocadas em contato com meio de cultura (RPMI) a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera úmida de 5% de  $\text{CO}_2$ , por 48h. A filtração do extrato foi realizada através de membrana de acetato de celulose com poros de  $0,45\mu\text{m}$ . As diluições seriadas dos extratos foram feitas a partir da concentração de 100%. Para cada 1ml foram adicionados 2ml de solução (RPMI) conforme a Figura 1.

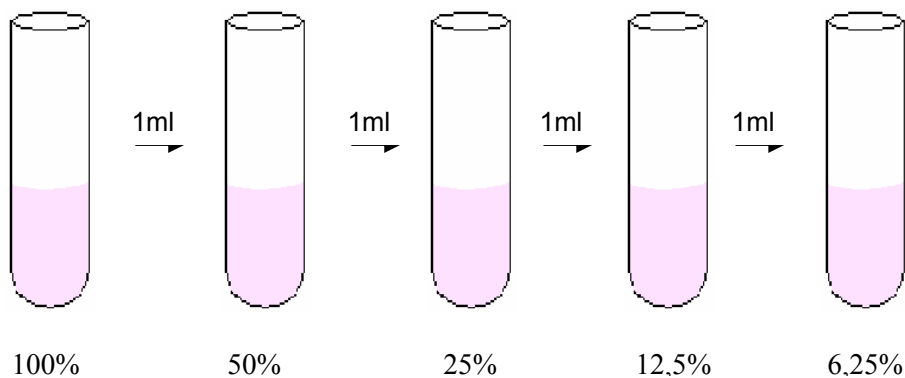


Figura 1. Diluição serial dos extratos.

A cultura de células utilizada é proveniente de uma linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), previamente selecionada através da formação de uma monocamada no fundo da placa. Essas células foram separadas pela proteína Tripsina. Após a tripsinização, a suspensão foi centrifugada ( $150^\circ\text{RPM}/5\text{min}$ ) e lavada com solução salina estéril (PBS), sendo o precipitado colocado em suspensão novamente em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. A

contagem de células foi feita em câmara de Neubauer para estabelecer uma concentração células por mililitro na ordem de 60.000cel/ml.

Uma microplaca de cultura celular com 96 poços foi preparada para cada amostra e para os controles da seguinte forma (Figura 2):

- Todos os poços continham 100µl de material para leitura final;
- Em todas as colunas foram feitas quatro repetições;
- A primeira coluna da placa é a Branca (sem células);
- A segunda e terceira colunas representam o meio com 100% de células vivas;
- A partir da quarta coluna foram pipetadas as diluições correspondentes às amostras (6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100%);
- A quantidade pipetada foi de 50 µl da solução da amostra e 50 µl da suspensão celular (~3000 células);

As placas preparadas foram incubadas por 72 horas em estufa à 37°C, e atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Passado este período, foi adicionado a cada poço 20 µl de corante composto de uma mistura de 0,2% de MTS e 0,09% de PMS em PBS; repetindo o processo de incubação por mais duas horas. A incorporação do corante foi avaliada por um leitor de microplacas (ELISA) tendo como comparação a coluna branca.

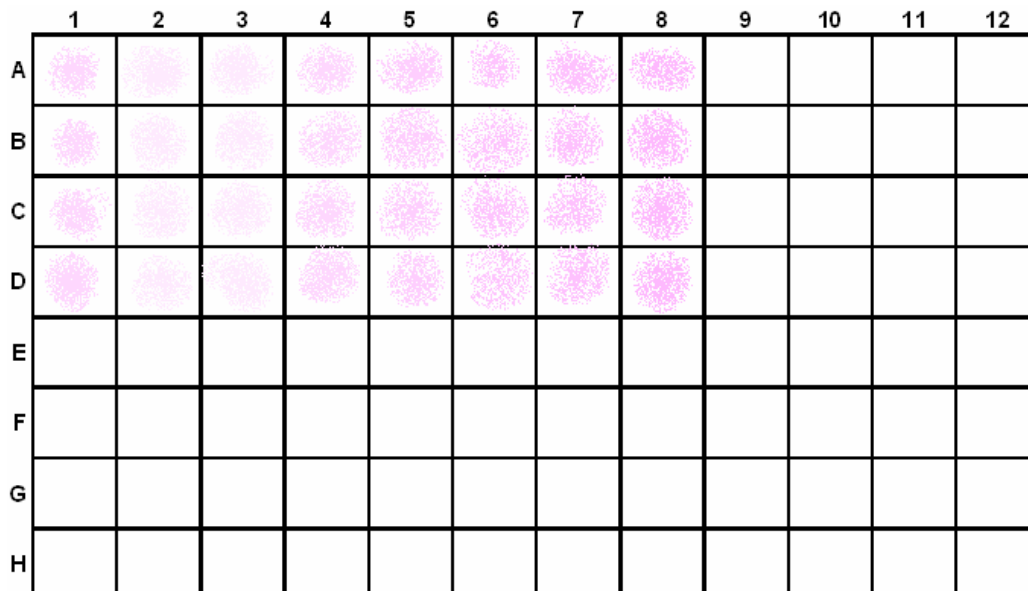


Figura 2. Esquema da microplaca: 1º coluna – Branca; 2ª e 3ª coluna – 100% células vivas; 4ª à 8ª coluna – diluições seriadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a literatura, para o processo de obtenção dos hidretos é necessário um ciclo de 3h a uma temperatura de  $\sim 500^{\circ}\text{C}$  para o titânio e nióbio, enquanto o zircônio necessita de temperatura mais elevada,  $\sim 800^{\circ}\text{C}$  <sup>(5,9)</sup>. Neste trabalho foram feitas alterações nas temperaturas de hidrogenação-desidrogenação já que o titânio estava na forma de lingote, o nióbio na forma de cavaco, e o zircônio na forma de esponja. A esponja de zircônio propiciou a mais rápida adsorção do hidrogênio graças a alta área superficial. Pela análise de DRX, foi verificado que todo o material ficou na forma de hidretos, Figura 3 A, B e C, por comparação com as fichas JPCDS do  $\text{TiH}_2$ ,  $\text{NbH}$ ,  $\text{ZrH}_2$ .

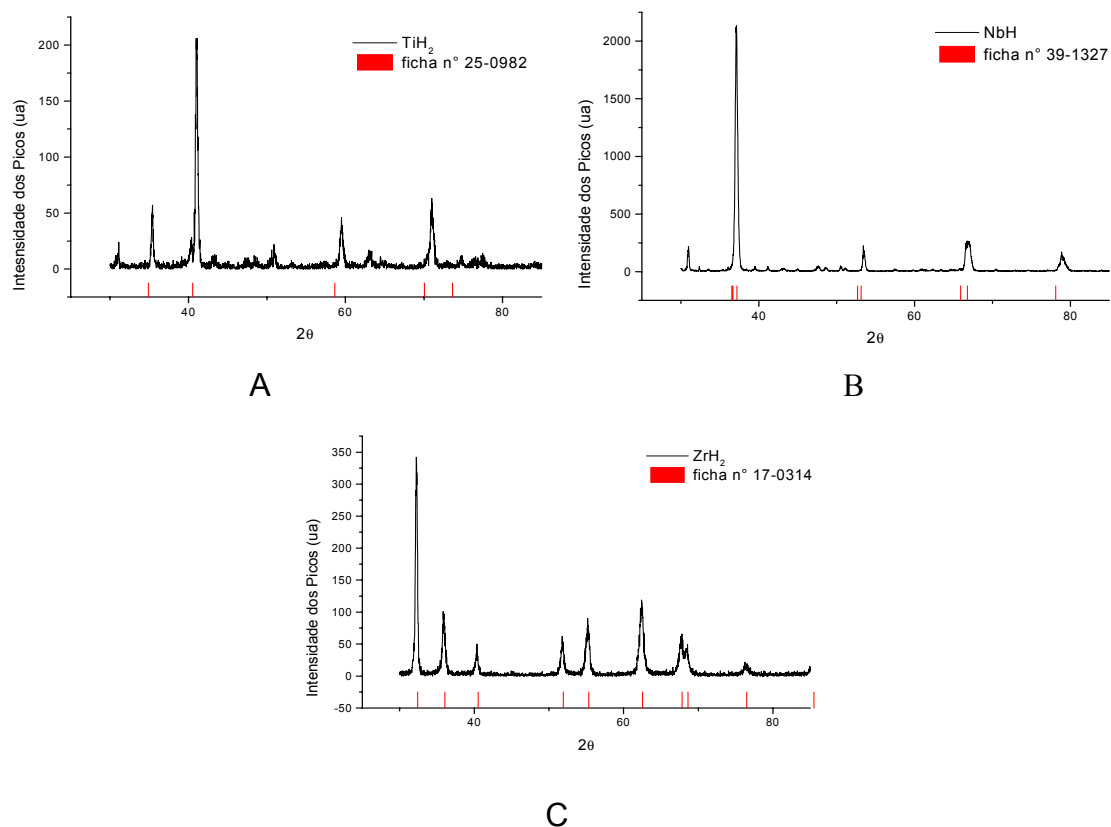


Figura 3. DRX: A) Hidreto de titânio ( $\text{TiH}_2$ ), B) Nióbio ( $\text{NbH}$ ) e C) Zircônio ( $\text{ZrH}_2$ ).

No processo moagem, foi utilizado moinho de bolas de alta energia para obtenção de um pó da liga bem fino e homogêneo, Figura 4.

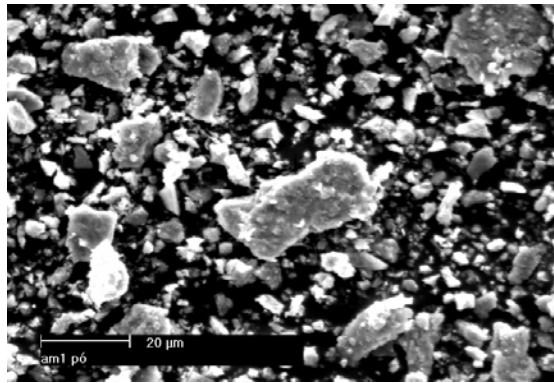


Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura do pó da liga.

Amostra sinterizada a 1150°C apresenta uma homogeneidade relativamente alta com pequenas regiões de material não reagido (Figura 5 a e b). Foram analisadas diversas regiões por energia dispersiva, Figura 6; alguns espectros obtidos são apresentados nas (Figura 7 a, b e c). A matriz apresenta valores próximos à estequiometria da liga, isto é, 74%Ti, 13% Nb e 13% Zr. As regiões escuras apresentam altas concentrações de titânio comparadas as outras regiões, e regiões mais claras apresentam concentrações mais elevada de zircônio ou nióbio, em relação à estequiometria média da liga.

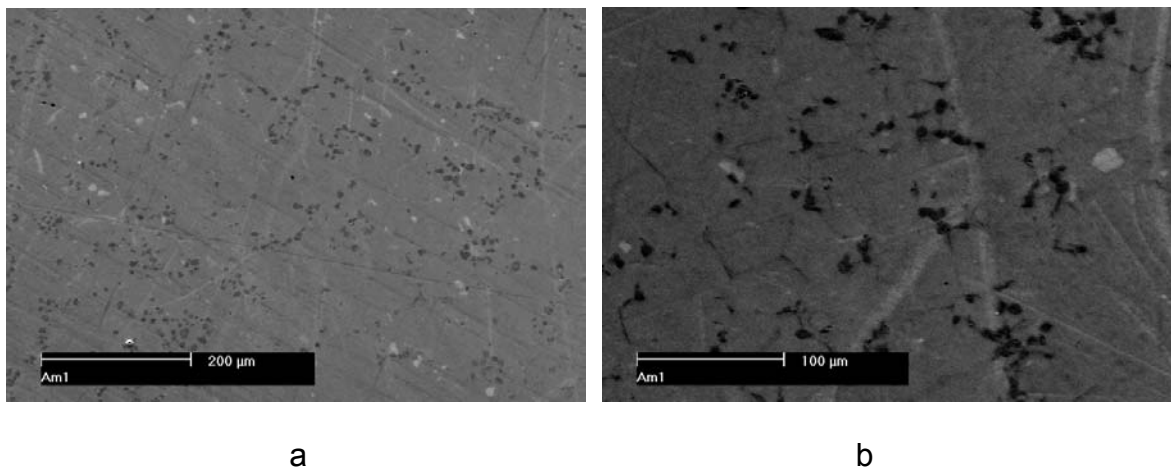


Figura 5. Micrografias eletrônicas de varredura da superfície atacada da amostra sinterizada.

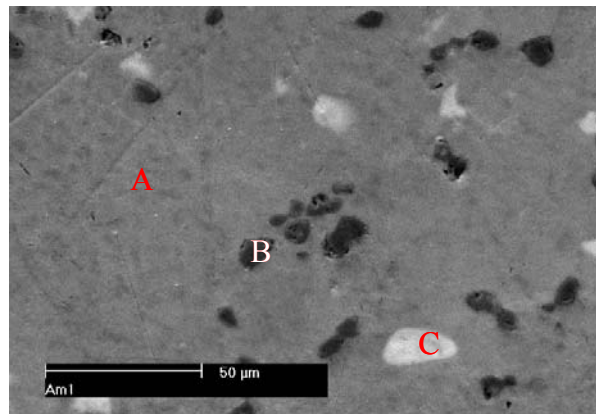


Figura 6. MEV da amostra sinterizada contendo matriz (A), região escura (B) e região clara.

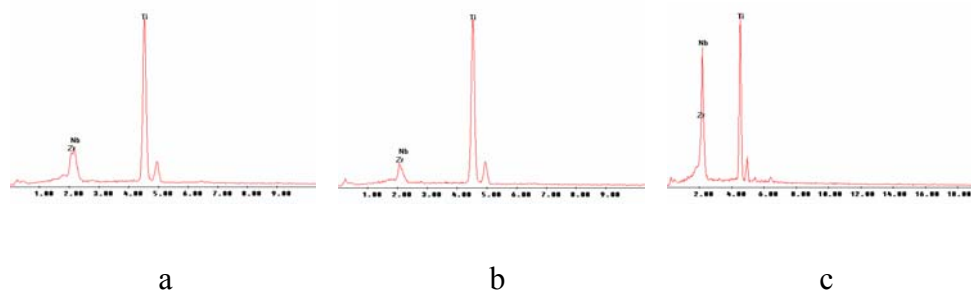


Figura 7. a) EDS da matriz da região (A); b) EDS da região escura da amostra (B) e c) EDS da região clara da amostra (C).

Tabela 2. Resultado semi-quantitativo de composição (massa%) da matriz (A), da região escura (B) e da região clara (C).

	Matriz	Escuro	Claro
Zr	14	11	10
Nb	13	5	39
Ti	73	84	51

Por DRX da amostra (Figura 8), foram observados picos nas fases  $\alpha$  e  $\beta$  do titânio, fases estas esperadas após o processamento por metalurgia do pó e sinterização <sup>(1)</sup>. Para a liga Ti-13Nb-13Zr não foram encontrados dados no banco JCPDS, a avaliação foi feita com os dados da fase  $\alpha$  e  $\beta$  do titânio puro que apresenta estrutura cristalina semelhante à fase  $\alpha$  ou  $\alpha'$  da liga <sup>(1, 10)</sup>. Não foram observados picos relativos à hidretos, óxidos ou intermetálicos.

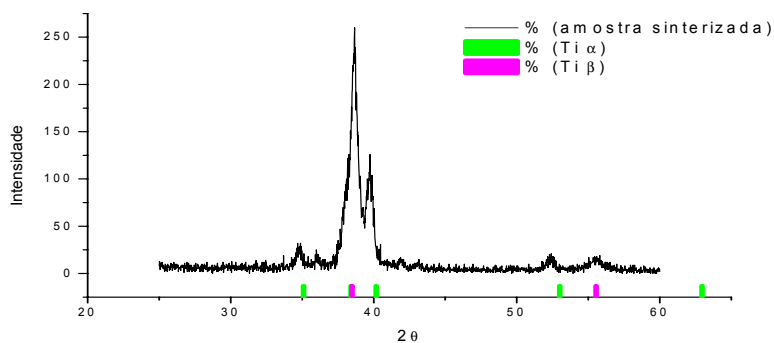


Figura 8. DRX da amostra sinterizada mostrando as fases  $\alpha$  e  $\beta$ .

No teste de citotoxicidade (Figura 9), o índice de citotoxicidade ( $IC_{(50\%)}$ ) foi determinado pela curva de interpolação onde a concentração do extrato do biomaterial que inibe 50% da incorporação do MTS. No gráfico, a curva obtida foi correlacionada entre o porcentual médio de células vivas e a concentração dos extratos. Como resultado, os hidretos do titânio e nióbio mostraram-se satisfatoriamente não citotóxicos. O zircônio está bem próximo do limiar de toxicidade, porém ainda sim aceitável <sup>(10)</sup>. Por espectroscopia de fluorescência de Raios X (Tabela 3) foram analisados os componentes da mistura do pó antes da sinterização, e observou-se a presença significativa de silício (Si) em concentração de  $1,05 \pm 0,02$  %, provavelmente oriundo do titânio em sua forma primária. Pequenas concentrações de ferro (Fe), tungstênio (W) e cromo (Cr) podem ser resultantes do processo de moagem. O Ráfínio (Hf) em concentração de  $0,28 \pm 0,01$  % na amostra é encontrado sempre junto ao zircônio na natureza devido à semelhança química, sendo muito difícil de separá-los. A presença deste material junto ao zircônio não interfere nos resultados de biocompatibilidade da liga formada <sup>(11)</sup>. O pó da liga se mostrou altamente citotóxico, com  $IC_{(50\%)} = 40$  (índice de citotoxicidade); valor mais elevado inclusive do que o controle positivo, onde  $IC_{(50\%)} = 75$ .

Uma das prováveis causas da citotoxicidade do pó da liga é a utilização de ciclohexano durante o processo de moagem. Apesar da tentativa de remoção deste composto por tratamento em vácuo, é provável que sobre algum resíduo, provocando essa reação deletéria às células <sup>(12)</sup>. Por ser um hidrocarboneto, este provavelmente é decomposto na fase de sinterização, onde o material ficou sob baixa pressão e altas temperaturas, eliminando qualquer resquícios de carbono <sup>(13)</sup>. O resultado apresentado pelo teste de citotoxicidade de que a amostra após a sinterização é biocompatível, comprova esta teoria.

Tabela 3. Composição do pó da liga, antes da sinterização, por EDXRF

Elemento	% em massa
Ti H <sub>2</sub>	75.2±0.1
ZrH <sub>2</sub>	11.64±0.02
NbH	11.8±0.02
Si	1.05±0.02
Fe	0.29±0.01
W	0.29±0.01
Hf	0.28±0.01
Cr	0.08±0.01

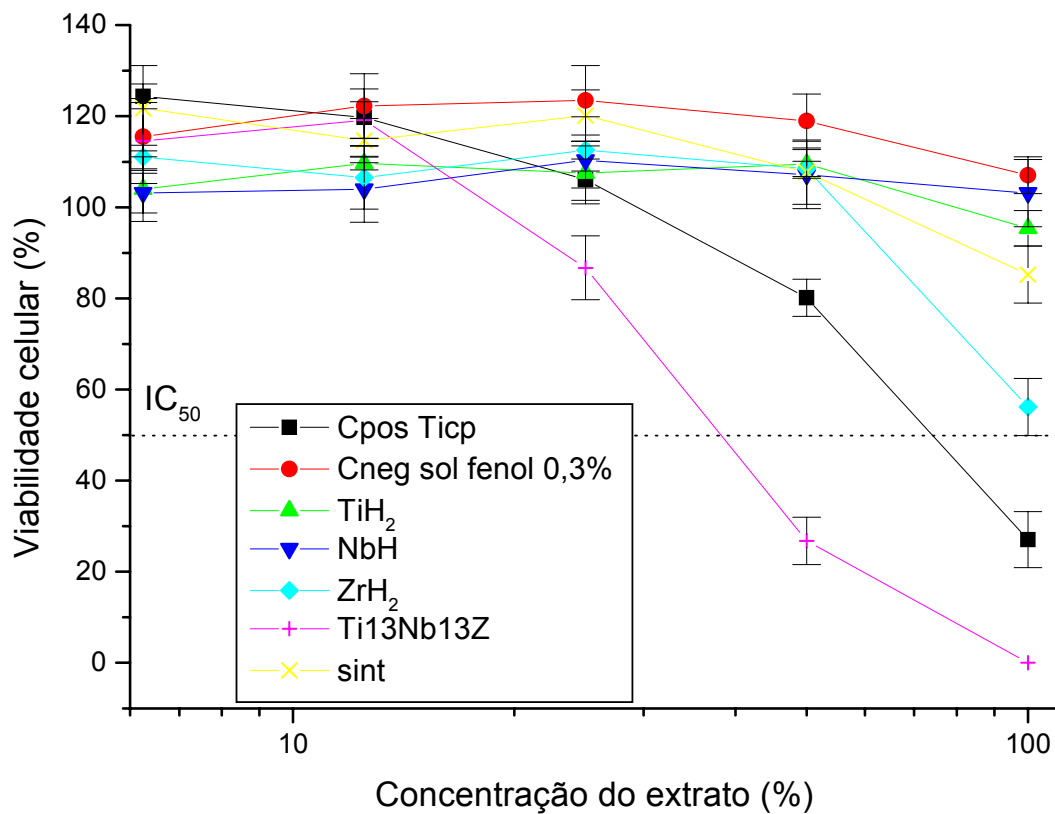


Figura 9. Gráfico de citotoxicidade dos materiais estudados: Controle Positivo (Cpos) - solução fenol com concentração de 0,3%; Controle Negativo (Cneg) – Ticp; Titânio hidrogenado (TiH<sub>2</sub>), Nióbio hidrogenado (NbH), Zircônio hidrogenado (ZrH<sub>2</sub>) e amostra sinterizada (sint).

## CONCLUSÕES

O processo de hidretação dos metais Ti, Nb e Zr ( $TiH_2$ ,  $NbH$ ,  $ZrH_2$ ) e o processamento por metalurgia do pó da liga de Ti-13Nb-13Zr, foram considerados adequados para obtenção de materiais biocompatíveis, já que a liga sinterizada também apresenta característica de biocompatibilidade, eliminando os produtos tóxicos do processo.

## AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro da FAPESP e do CNPq, e ao aluno de iniciação científica José Hélio Durvaizem pelo apoio nos procedimentos laboratoriais.

## REFERÊNCIAS

- 1 SCHNEIDER, S.G. **Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial**. Tese de doutoramento. Instituição de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo, 141 páginas, 2001.
- 2 KHAN, M.A.; WILLIAMS, R.L.; WILLIAMS, D.F. The Corrosion Behaviour of Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in Protein Solutions. **Biomaterials**, v.20, p.631-637, 1999.
- 3 MORAIS, L.S.; SERRA, G.S.; ELIAS, C.N.; MULLER, C.A. Liberação *in vivo* de íons metálicos por mini-implantes ortodônticos de titânio. **4º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, trabalho completo, 2006.
- 4 MISCH, C.E. **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: Santos, pp. 685, 2000.
- 5 HENRIQUES, V.A.R; SILVA, C. R. M. DA; BRESSIANI, J. C. Utilização de técnicas de Metalurgia do Pó (M/P) na Obtenção da Liga Ti-13Nb-13Zr. **Revista Metalurgia e Materiais**, vol. 59, nº 532, abril 2003.
- 6 LIU, X.; CHU, P.K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, vol. 47, n. 3-4, pp. 49-121, 2004.
- 7 ALEFELD, G. & VÖLKL, J. **Hydrogen in Metals I – Basic Properties**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1978.
- 8 KORNILOV, I.I. **Titanium and its Alloys**. New York: Daniel Davey & CO., INC., 1963.

---

9 TADDEI, E.B.; HENRIQUES, V.A.R.; SILVA, C.R.M.; CAIRO, C.A.A. Production of a new Titanium Alloy for Orthopedic Implants. ***Materials Science and Engineering C***, vol. 24, n. 5, pp. 683-687, 2004.

10 BOTTINO, M.C.M. ***Estudo da osteointegração da Liga Ti-13Nb-13Zr obtida por metalurgia do pó com diferentes graus de porosidades***. Tese de mestrado. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, São Paulo, 127 páginas, 2005.

11 ELLINGSEN, J.E; LYNGSTADAAS, S.P. ***Bio-Implant Interface***. CRC Press, pp. 448, 2003.

12 ATKINS, P & JONES L. ***Princípios de química***. São Paulo: Artmed Editora L,tda, pp.851, 2002.

13 QUAGLIANO, V.J. & VALLARINO, M. L. ***Química***. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., pp. 801, 1973.

## CYTOTOXICITY EVALUATION OF POWDERS HYDRIDE - Ti, Nb e Zr

### ABSTRACT

Biomaterials are widely required on medicine nowadays, replacing or promoting repair of tissues or organs. In the specific field related to metallic biomaterials, there are unnumbered biocompatible alloys possible to the human body. The commercially pure titanium (cpTi) is comproved by scientific literature to present excellent biocompatible characteristics. In the present work it was evaluated by *in vivo* testing the cytotoxicity of hydrides from compounds of the Ti-13Nb-13Zr alloy, sintering alloy and cpTi. The tested materials were added to culture medium for 48 hours incubated at 37°C with moisturized atmosphere (5% of CO<sub>2</sub>). The diluted extract was submitted under a supravital dye from tetrazolium compound (MTS) and an electron coupling reagent (PMS). After the incubation period, it was evaluated by spectrophotometry, the amount of surviving cells in the culture medium. The results proved that the hydride medium obtained through the hydrogenation-dehydrogenation process and the sintered alloy are not cytotoxics.

Key-words: titanium alloys, metals hydrides, powder metallurgy, cytotoxicity.