

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE COMPOSTOS NANOESTRUTURADOS A BASE DE TITANIO

J Marchi^{1,a}, D.R.R. Lazar², V. Ussui², T.F.Cunha³, O.Z. Higa³

¹Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC),
Santo André (SP), Brasil

²Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (CCTM), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
(IPEN), São Paulo (SP), Brasil

³Centro de Biotecnologia (CB), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN),
São Paulo (SP), Brasil

E-mail: juliana.marchi@ufabc.edu.br^a

Resumo. Titânio e suas ligas são utilizados em implantes ortopédicos e dentários devido à combinação de suas propriedades, tais como resistência mecânica e comportamento bioinerte quando em contato com tecidos adjacentes. Por outro lado, em casos onde a reconstrução tecidual se faz necessária, materiais com comportamento bioativos devem ser indicados. Para estes casos, cerâmicas a base de titânia podem ser uma alternativa devido ao seu comportamento bioativo, e são normalmente utilizadas enquanto recobrimento metálico. Recentemente, foi proposto o desenvolvimento de um biomaterial nanométrico estrutural a base de compostos de titânia. Estes materiais podem ser sintetizados através de diferentes processos, entre eles por síntese hidrotermal. Apresentam em geral características físicas favoráveis, tais como alta área superficial. Além disso, a adição de outros elementos, tais como zircônia e fosfatos na rede da titânia podem promover alterações nas suas propriedades, permitindo novas aplicações de tais compostos. No entanto, estes pós devem ser melhor investigados através de testes in vitro para avaliar a sua citotoxicidade, como primeira condição a ser satisfeita para o uso enquanto material biológico. Neste trabalho, compostos nanométricos a base de titânio foram preparados utilizando-se o processo de síntese hidrotermal em meio alcalino com pós precursores de titânia comercial associado a zircônia em diferentes proporções e fosfato. Os pós foram prensados uniaxialmente e os diferentes compostos analisados utilizando-se testes in vitro. Os testes de citotoxicidade foram realizados com linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1), de acordo com a norma ISO 10993-5. Em geral, mesmo com as dimensões reduzidas das partículas, os nanotubos de titânio incorporados com zircônia em diferentes concentrações foram considerados não citotóxicos, sendo possível sua utilização enquanto biomaterial. No entanto, os pós de nanotubos de titânio puro e dopados com fosfato foram considerados materiais citotóxicos.

Palavras-chave: Nanotubos de titânio, Dopagem, Biomateriais, Citotoxicidade, Testes in vitro.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biomateriais sintéticos, naturais ou híbridos, depende da contribuição de profissionais com uma vasta gama de competências, em várias áreas do conhecimento. Assim, estudos envolvendo os procedimentos de síntese, otimização do

processamento dos materiais, bem como resposta do tecido implantado quando em contato com o tecido hospedeiro, precisam ser realizados em sintonia para selecionar as melhores características de um material de implante para uma aplicação específica (PARK & LAKES, 2010; SCHIEKER et al., 2006; SHIEH & VACANTI 2005). Após a implantação do biomaterial em tecidos vivos, as interações são inevitáveis, sendo o mais adequado a utilização de materiais que interajam com os tecidos de forma mais favorável ao hospedeiro. Desta forma, biocompatibilidade se refere à habilidade do material de induzir uma resposta apropriada do hospedeiro em uma situação específica (WILLIAMS, 1996). Para serem biocompatíveis, os biomateriais também devem atender a algumas condições, tais como permitir o crescimento de vasos ao redor e migração de células (WEYAND & SCHROEDER, 2005).

Os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, bioativos ou reabsorvíveis, de acordo com seu comportamento biológico quando em contato com o tecido hospedeiro (HENCH, 1991; RAVAGLIOLI & KRAJEWSKI, 1992). Os materiais bioativos, destacando-se a hidroxiapatita, algumas composições de biovidros e a titânia (HENCH, 1998), são aqueles que promovem a formação de uma forte ligação química entre o material e o tecido, através da indução de uma resposta biológica na interface do material (KAWABATA et al., 2011).

Desde 1950, o titânio e suas ligas têm sido utilizados com sucesso como materiais de base para próteses dentárias e ortopédicas (NATH, 2010; LONG & RACK, 1998). A biocompatibilidade e resistência a corrosão são geralmente atribuídas à camada de passivação do óxido de titânio (TiO_2), que é basicamente amorfa e morfologicamente homogênea (SUL et al., 2001). Os materiais cerâmicos a base de TiO_2 também podem ser utilizados enquanto biomaterial (ZHANG et al., 1998; HUANG et al., 1998, NAN et al., 1998). Este material cerâmico pode induzir a formação de apatita *in vitro* (KASUGA et al., 2002; WANG et al., 2002) e estimular a osteocondutividade *in vivo* (UCHIDA et al., 1999). Esta bioatividade é baseada na sua habilidade de se ligar diretamente ao osso após um período curto de implantação (WU et al., 2004). Estas cerâmicas não são citotóxicas quando em contato com hepatócitos e cardiomiócitos de ratos (VON WALTER et al., 2005).

No entanto, estas cerâmicas são propostas para serem utilizadas em camadas bioativas na superfície de implantes. Alguns métodos para ampliar o seu campo de aplicações incluem a preparação de cerâmicas a partir de pós nanoestruturados (LEE et al., 2003; LEE & ZUO, 2004). Estes materiais podem ser sintetizados através de diferentes processos, tais como sol-gel, hidrólise térmica, hidrólise em meio aquoso e síntese hidrotermal (DEBNATH & GHOSH, 2009). Apresentam em geral características físicas favoráveis, tais como alta área superficial. Além disso, a adição de outros elementos, tais como zircônia e fosfatos na rede da titânia podem promover alterações nas suas propriedades, permitindo novas aplicações de tais compostos. No entanto, estes pós devem ser melhor investigados através de testes *in vitro* para avaliar a sua citotoxicidade, como primeira condição a ser satisfeita para o uso enquanto material biológico.

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da citotoxicidade de nanotubos a base de titânia contendo modificações por fosfato e zircônio em diferentes proporções visando o desenvolvimento de biomateriais alternativos.

2. MATERIAIS AND MÉTODOS

Neste trabalho, compostos nanoestruturados a base de titânio (TNT) foram preparados via síntese hidrotermal em meio alcalino de pós comerciais de titania

conforme trabalho publicado anteriormente (YOSHITO *et al.*, 2009). Em uma descrição breve, consiste na mistura de óxido de titânio comercial com os diferentes dopantes em meio fortemente alcalino e seu tratamento hidrotérmico a 150 °C em um reator pressurizado. As modificações estruturais foram feitas com a dopagem de zircônia em diferentes proporções (5, 10 e 15 mol% TNT-Zr-X, X=5, 10 ou 15) ou fósforo (TNT-PO₄, com 10 mol %).

Os nanotubos foram analisados por difração de raios-X (DRX, Multiflex, Rigaku), na faixa angular de 2θ entre 5° e 80°, passo de varredura de 2°/min. Os espectros de difração resultantes foram analisados utilizando-se o programa *Search-Mach* e comparados com o banco de dados PDF-ICDD para identificação das fases presentes. A influência da adição de zircônio ou fósforo na morfologia dos pós de nanotubos de titânia foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG, JSM 6701S, JEOL).

Os pós obtidos foram compactados uniaxialmente (50 MPa) e a biocompatibilidade das amostras foi analisada utilizando-se ensaios *in vitro*. A citotoxicidade foi avaliada por meio de metodologia quantitativa de acordo com as diretrizes descritas na norma ISO 10993, parte 5 referente a citotoxicidade. O ensaio utilizado se baseia na determinação de células viáveis após a exposição da população celular a diversas concentrações do extrato obtido.

Após a incubação das amostras em meio de cultura celular RPMI (Gibco®) sem soro a 37° C por 24 h, foi realizado um controle visual da coloração dos extratos, assim como o controle do pH das soluções. Os extratos obtidos foram pipetados (50 ul) em placas de cultura de 96 poços sobre as células CHO, previamente incubadas por 24 h em estufa com 5% de CO₂.

A análise da quantidade de células viáveis foi realizada por metodologia colorimétrica, pela incorporação de corante supravital e um agente acoplador de elétrons (MTS/PMS). Para a coloração do extrato não interferir no resultado do corante vital, antes de adicionar a solução de MTS/PMS, os sobrenadantes foram aspirados dos poços e as células aderidas foram lavadas com solução de PBS pH 7,4. Após a lavagem adicionaram-se 100 µL de meio de cultura com soro e 20 µL da solução do corante MTS/PMS. As placas foram incubadas por mais 2 h e em seguida lidas em leitor de placas a 490 nm. A quantidade de corante incorporada pela população celular é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura. A morfologia das células foi acompanhada em microscópio óptico após o mesmo período de análise.

A relação entre a concentração do extrato e a quantidade de células viáveis resultou em curva dose-resposta e o parâmetro utilizado para avaliação da citotoxicidade foi calculado pela concentração do extrato que matou 50 % das células expostas (Concentração Inibitória – CI50%).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química dos nanotubos

A Figura 1 apresenta os difratogramas de raios X dos compostos nanoestruturados a base de titânio puro ou dopado com zircônio ou fósforo. É possível observar que a fase majoritária de todos os compostos é a fase de titanato de titânio (H₂Ti₂O₅). Os pós de TNT puro e dopado com fósforo apresentam somente esta fase cristalina. Com a dopagem com zircônio, observa-se a diminuição significativa de picos não tão intensos desta fase e o aparecimento das fases de óxido de zircônio (ZrO₂), sendo mais evidenciados em concentrações de zircônio maior que 5% mol.

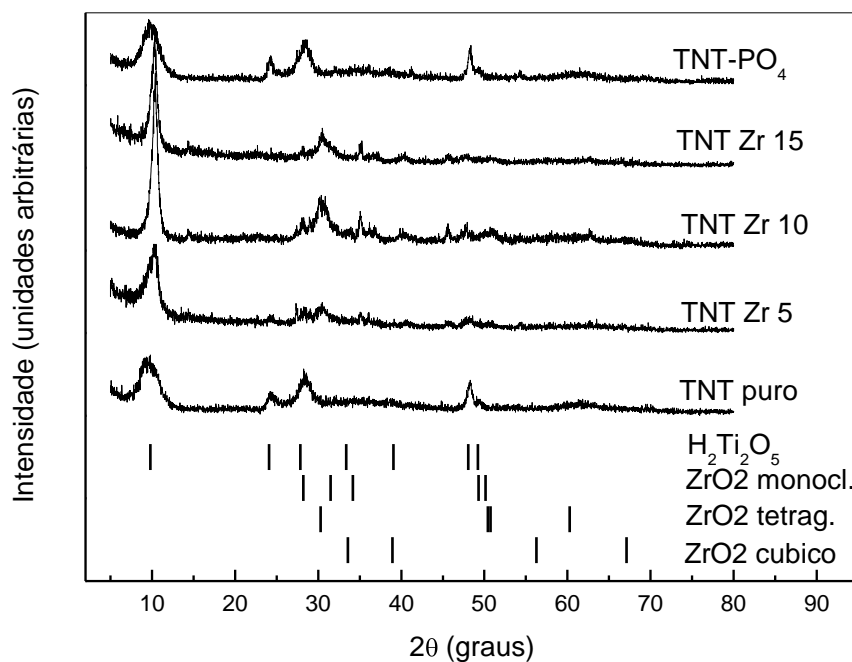


Figura 1: Difratogramas de difração de raios X dos compostos nanoestruturados de titânio

A morfologia dos pós de compostos nanoestruturados a base de titânio foi observada por MEV-FEG para evidenciar a influência da incorporação do zircônio na morfologia dos pós (Figura 2). Pode-se observar que os nanotubos são apresentados na forma de bastonetes alongados para todas as composições estudadas, e que na realidade são nanotubos ocos com crescimento preferencial na direção [0 1 0]. O nanotubo de titânio puro (Figura 2a) apresenta-se mais desaglomerado em comparação aos nanotubos com zircônio incorporado (Figura 2 b-d). Além disto, conforme aumenta-se progressivamente a quantidade de zircônio adicionado durante a síntese do material, verifica-se que eles tornam-se mais grossos e unidos em forma de bastões com diâmetro aproximado de 200 nm para as amostras contendo até 10% de zircônio (Figura 2 b e c) e chegando-se até aproximadamente 350 nm para as amostras contendo 15% de zircônio (Figura 2d).

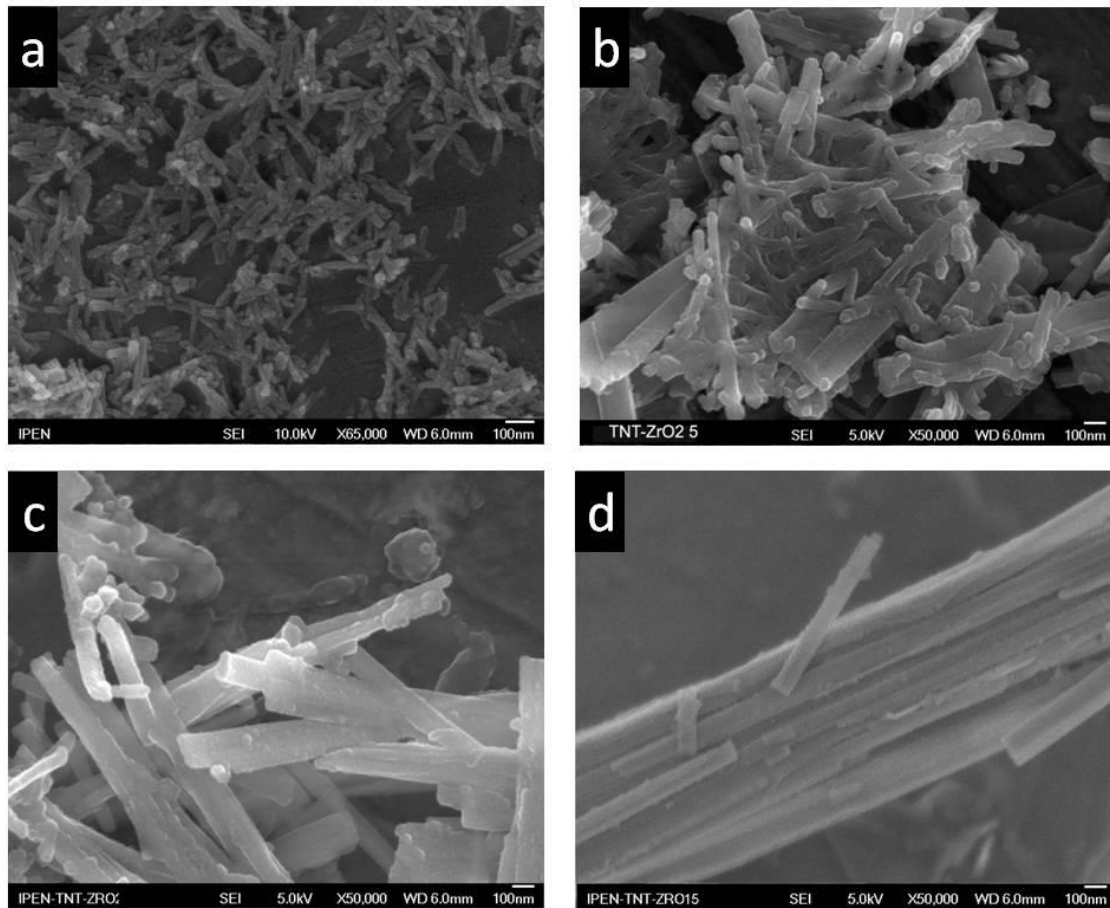


Figura 2: Micrografias eletrônicas de varredura de alta resolução (MEV-FEG) de pós dos compostos nanoestruturados de titânio: a) TNT puro; b) TNT-Zr 5; c) TNT-Zr 10; d) TNT-Zr 15.

3.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos nanotubos

As Figuras 3 e 4 mostram a coloração dos extratos (na concentração de 100%) após a incubação das amostras em meio de cultura celular por 24 h. Em relação a coloração do controle negativo (alumina), os extratos de todas as amostras apresentaram coloração alterada. A amostra de TNT dopado com fósforo foi o que apresentou a maior alteração na coloração, seguido pela amostra de TNT puro. As amostras de TNT dopadas com zircônio apresentaram coloração alterada, diminuindo a sua intensidade conforme maior a quantidade de zircônio adicionado no TNT.

A Tabela I apresenta os valores de pH dos extratos iniciais das amostras. Pode-se verificar que as amostras de nanotubo de titânio puro e titânio dopados com fósforo não apresentaram diferenças de valores de pH em relação aos controles negativo e positivo. No entanto, as amostras de nanotubos dopados com zircônia apresentaram valores de pH maiores, indicando soluções mais básicas quando comparados com os nanotubos puros, porém sem uma tendência em relação a quantidade de zircônio adicionado. As amostras com pH igual a 7,5 (TNTs puro e dopados com fósforo) foram as que apresentaram solução com coloração mais avermelhada.

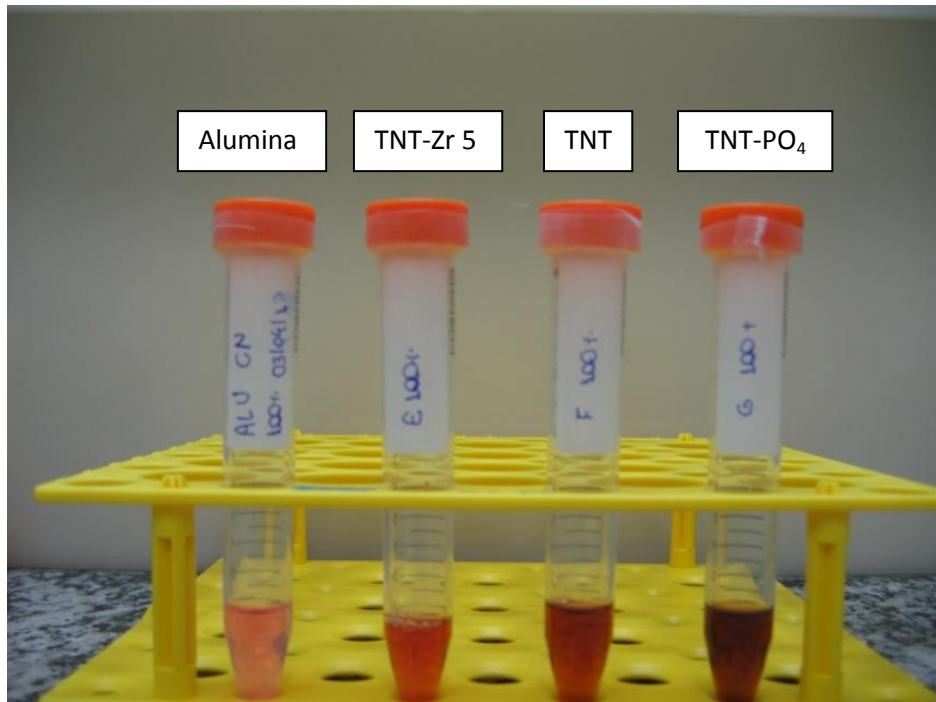


Figura 3: Fotografia dos extratos do controle negativo (alumina) e das amostras TNT-Zr 5, TNT e TNT-PO₄ na concentração de 100 %

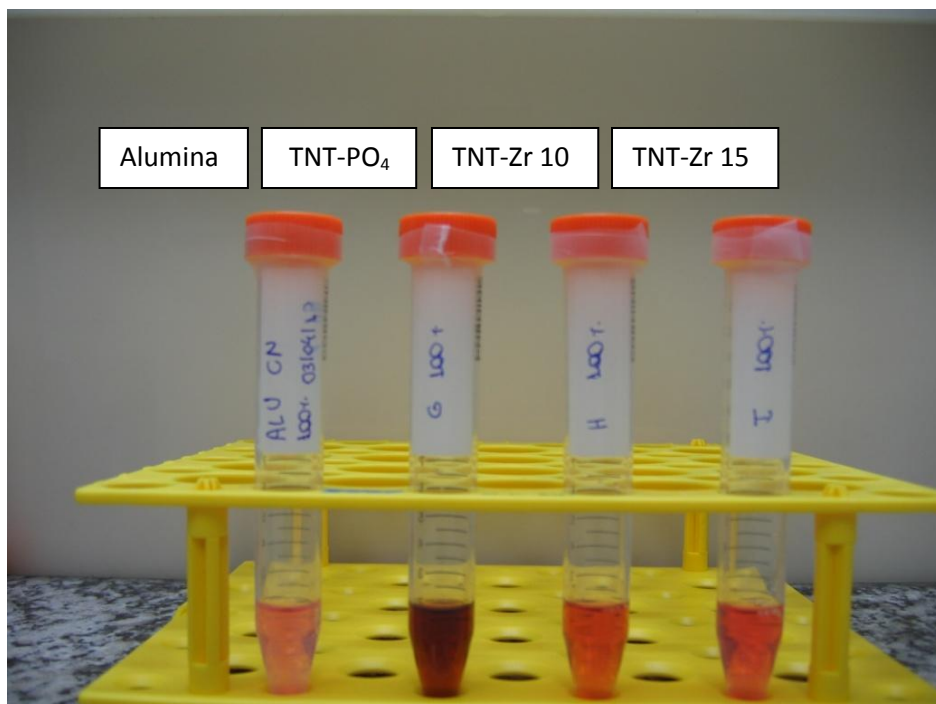


Figura 4: Fotografia dos extratos do controle negativo (alumina) e das amostras TNT-PO₄, TNT-Zr 10 e TNT Zr-15 na concentração de 100 %

Tabela 1: Valores de pH dos extratos na concentração de 100 % após 24 h de incubação das amostras

Extratos	pH
Controle Negativo (Alumina)	7,5
Controle Positivo (Fenol 0,3%)	7,5
Amostra TNT	7,5
Amostra TNT-Zr 5	9,0
Amostra TNT-Zr 10	8,5
Amostra TNT-Zr 15	9,5
Amostra TNT-PO ₄	7,5

A Figura 5 apresenta a morfologia das células em microscópio óptico após ensaio colorimétrico MTS. Pode-se observar que, na utilização do controle negativo (alumina, Figura 5 a), as células estão aderidas e numerosas, apresentando padrões de comportamento típicos de células viáveis, como era de se esperar. Por outro lado, na utilização do controle positivo (solução fenol 0,3%, Figura 5b) as células se apresentam pouco numerosas e morfologia circular, característica de células inviáveis. A morfologia celular dos extratos contendo nanotubo puro (Figura 5 c) e dopado com fósforo (Figura 5g) apresentaram-se similar ao controle positivo, indicando uma possível toxicidade do material. Já a morfologia celular dos extratos contendo nanotubos dopados com zircônio (Figuras 5 d-f) apresentaram-se semelhante ao controle negativo, mostrando que o material não interferiu na morfologia celular.

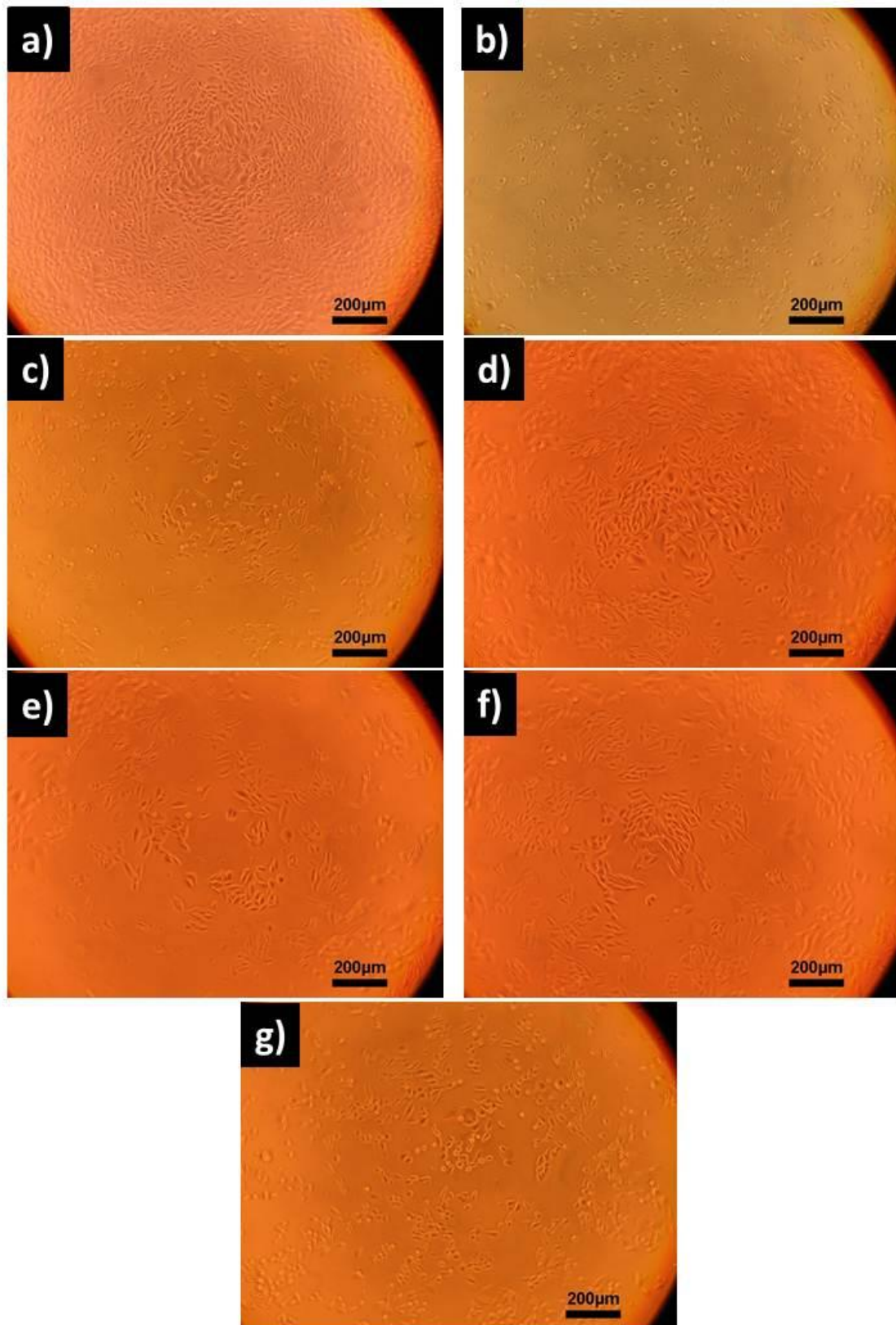


Figura 5: Fotomicrografias ópticas da morfologia das células em após ensaio colorimétrico MTS com extrato de 100% em diferentes amostras. a) controle negativo (alumina); b) controle positivo (solução fenol 0,3%); c) TNT; d) TNT-Zr 5; e) TNT-Zr 10; f) TNT-Zr 15; g) TNT-PO₄.

A Figura 6 apresenta o gráfico da curva dose-resposta da viabilidade celular em função da concentração dos extratos dos controles e das amostras. Todos os materiais apresentaram curva de viabilidade celular acima da linha correspondente a 50% de viabilidade celular para todas as composições até o extrato de 50%. Porém, na concentração de 100% do extrato, as amostras de nanotubo de titânio puro e dopado com fósforo apresentaram viabilidade celular abaixo ou próximo de 50% de viabilidade, indicando a citotoxicidade destes materiais.

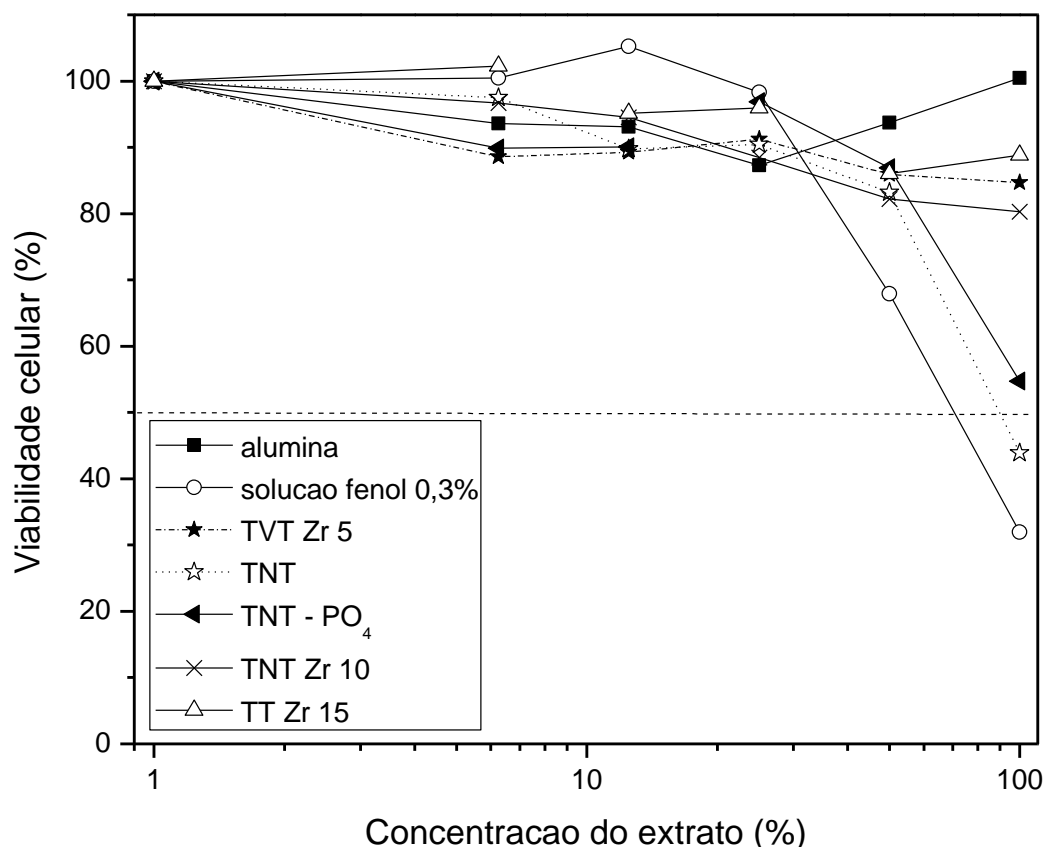


Figura 6: Curvas de viabilidade celular dos controles e das amostras de nanotubos a base de titânio obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico MTS.

Estes resultados estão de acordo com o observado em fotomicrografias ópticas da morfologia das células após o ensaio colorimétrico MTS com extrato de 100% em diferentes amostras (Figura 5). Além disso, estas amostras apresentaram diferença de coloração do extrato de 100%, como apresentados nas Figuras 3 e 4. Uma possível explicação para a citotoxicidade apresentada dos nanotubos puro e dopado com fósforo pode ser a morfologia e o tamanho/distribuição de tamanho dos nanotubos. Estes materiais apresentam-se menores e mais soltos, possivelmente permitindo a sua passagem pelo poro do filtro durante o procedimento experimental de filtragem dos extratos. Desta forma, acredita-se que o contato direto destas amostras tenha, de alguma forma, alterado as características celulares e provocado alterações significativas em seu metabolismo, levando a diminuição significativa da viabilidade celular. Estudos complementares de análise dos elementos presentes em solução serão realizados para comprovar esta hipótese.

4. CONCLUSÕES

A avaliação da citotoxicidade dos materiais nanoestruturados a base de titânio incorporados com fosfato ou zircônio em diferentes proporções, através do método dos extratos utilizando o corante MTS, foi complementada por avaliações morfológicas das células e controle visual da coloração do extrato e pH da solução. As características físicas do material parecem interferir no comportamento biológico dos materiais. Em geral, mesmo com as dimensões reduzidas das partículas, os pós de titânia incorporados com zircônia em diferentes concentrações foram considerados não citotóxicos, sendo possível sua utilização enquanto biomaterial. No entanto, os pós de titânia puro e dopados com fosfato foram considerados materiais citotóxicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UFABC, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro; ao CCTM/IPEN, especialmente aos laboratórios de Microscopia e Difração de raios-X pela infraestrutura e colaboração.

REFERÊNCIAS

- DEBNATH S, GHOSH UC. Nanostructured hydrous titanium (IV) oxide: Synthesis, characterization and Ni(II) adsorption behavior. **Chemical Engineering Journal**, v. 152 p. 480–491, 2009.
- HENCH LL. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v.74, p. 1487-1510, 1991.
- HENCH LL, WILSON J. **An introduction to bioceramics**. Advanced Series in Ceramics, v. 1, World Scientific, USA, 1998.
- HUANG N, CHEN YR, LUO JM et al. In vitro investigation of blood compatibility of titanium oxide films. **Journal Biomedical Materials**, v. 42, p. 404-412, 1998.
- KASUGA T, KONDO H, NOGAMI M. Apatite Formation on TiO₂ in simulated body fluid. **Journal of Crystal Growth**, v. 235, p. 235-340, 2002.
- KAWABATA K, YAMAMOTO T, KITADA A. Substitution mechanism of Zn ions in β -tricalcium phosphate. **Physica B. Condensed Matter**, v. 406, p. 890-894, 2011.
- LEE GH, ZUO J-M. Growth and phase transformation of nanometer-sized titanium oxide powders produced by the precipitation method. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 87, p. 473-479, 2004.
- LEE, YI, LEE, J-H, HONG SH, KIM D-Y. Preparation of nanostructured TiO₂ ceramics by spark plasma sintering. **Materials Research Bulletin**, v. 38, p. 925-930, 2003.
- LONG M, RACK HJ. Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. **Biomaterials**, v. 19, p. 1621-1639, 1998
- NAN HPY, XUAN C, YONGXANG L et al. Blood compatibility of amorphous titanium oxide films synthesized by ion beam enhanced deposition. **Biomaterials**, v. 19, p. 771-776, 1998.
- NATH S. **Materials for Orthopedic Applications, in Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- PARK J, LAKES RS. **Biomaterials: An Introduction**. 3ed. Springer, 2010.
- RATNER B, HOFFMAN A, SCHOEN F, LEMONS J (Editors). **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 4th Edition. San Diego: Academic Press, 2004.
- RAVAGLIOLI A, KRAJEWSKI A. **Bioceramics: Materials, Properties and Applications**. Chapman & Hall, 1992.
- SCHIEKER M, SEITZ H, DROSSE I, SEITZ S, MUTSCHLER W. Focus on Biomaterials. Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering. **European Journal of Trauma**, v. 32, p. 114-124, 2006.
- SUL Y-T, JOHANSSON CB, JEONG Y, ALBREKTSSON T. The electrochemical oxide growth behavior on titanium in acid and alkaline electrolytes. **Medical Engineering and Physics**, v. 23, p. 329-346, 2001.
- SHIEH SJ, VACANTI JP. Surgical research review. State-of-the-art tissue engineering: From tissue engineering to organ building. **Surgery**, v. 137, p. 1-7, 2005.

- UCHIDA M, KIM H-M, KOKUBO T, NAKAMURA T. **Apatite-forming ability of titania gels with different structures.** In: Ohgushi H, Hastings GW, Yoshikawa T (ed) Bioceramics Singapore: World Scientific Publishing, p.149-152, 1999.
- VON WALTER M, RÜGER M, RAGOB C et al. In vivo behavior of a porous TiO₂/perlite composite and its surface modification with fibronectin. **Biomaterials**, v. 26, p.2813-2826, 2005.
- WANG XX, HAYAKAWA S, TSURU K, OSAKA A. Bioactive titania gels layers formed by chemical treatment of Ti substrate with a H₂O₂/HCl solution. **Biomaterials**, v. 23, p. 35-39, 2002.
- WEYAND B, SCHROEDER HP VON. Bone challenges for the hand surgeon: from basic bone biology to future clinical applications. **Clinical Plastic Surgery**, v. 32, p. 537-547, 2005.
- WILLIAMS, DF. Introduction: implantable materials and infection. *Injury*; v. 27, p. S-C1-4, 1996.
- WU, J-M, HAYAKAWA S, TSURU K, OSAKA A. Low-temperature preparation of anatase and rutile layers on titanium substrates and their ability to induce in vitro apatite deposition. **Journal of the American Ceramic Society**, v., 87, p.1635-1642, 2004.
- YOSHITO WK, FERREIRA NAM, RUMBAO ACSC, LAZAR DRR, USSUI V. Hydrothermal synthesis of nanostructured titania. **Anais do 7th Latin American Conference on Powder Technology**, Atibaia (SP), 2009, ref 205-009.
- ZHANG F, ZHENG Z, CHEN YX, LIU X, CHEN A, JIANG Z. In vivo investigation of blood compatibility of titanium oxide films. **Journal of Biomedical Materials**, v. 42, p. 129-233, 1998.

CYTOTOXICITY BEHAVIOR OF TITANIUM BASED NANOSTRUCTURED COMPOUNDS

J Marchi^{1,a}, D.R.R. Lazar², V. Ussui², T.F.Cunha³, O.Z. Higa³

¹Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André (SP), Brasil

²Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (CCTM), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo (SP), Brasil

³Centro de Biotecnologia (CB), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo (SP), Brasil

E-mail: juliana.marchi@ufabc.edu.br^a

Abstract. Titanium and titanium alloys are used in ortopaedic and dental implants due to their properties, such as mechanical resistance and bioinert behavior when in contact with adjacent tissues. On the other hand, in cases when the tissue reconstruction is required, a bioactive material should be preferably chosen. In these cases, titania based ceramics can be a suitable alternative, normally used as metallic coating, due to its bioactive behavior. Recently, the development of a new structural nanoscaled biomaterial based on titania compounds, is proposed. These nanotubes powders materials can be synthesized through different process, such as hydrothermal synthesis. These powders present in general suitable physical characteristics, such as high surface area. Moreover, the addition of other elements, such zirconia and phosphate on the titania lattice can promote different properties, allowing new applications of such compounds. However, these powders should be better investigated through in vitro tests in order to evaluate the cytotoxicity of such materials, the first condition to be achieved in order to use them as biological materials. In this work, titanium based nanoscaled compounds were prepared through hydrothermal synthesis in alkaline media of commercial titania powder associated with zirconia in different proportion and phosphate. The powders were uniaxially pressed and the different compounds were analyzed through in vitro tests. The cytotoxicity tests were performed with Chinese hamster ovary cell line (CHO-k1), according to ISO 10993-5. In general, although the reduced dimensions of the particles, zirconia doped powders were considered non cytotoxic, allowing them to be used as biomaterials. On the other hand, pure titania nanotubes and fosfate incorporated titania natotubes can be considered citotoxic materials.

Keywords: Titanium nanoscaled, biomaterials, cytotoxicity, in vitro test.