

Copyright 2010, ABRACO

Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2010, em Fortaleza/CE no mês de maio de 2010.

As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

### **Biocompatibilidade e comportamento eletroquímico de titânio eletropolido com e sem filmes de DLC (Diamond-Like Carbon)**

Taíse Manhabosco<sup>1</sup> (PQ), Sílvia M. Tamborim<sup>2</sup> (PQ), André Jarenkow<sup>2</sup> (IC), Moema Q.Vieira<sup>3</sup> (PG), Mariana M. Ilha<sup>3</sup> (IC), Léo Anderson M. Martins<sup>3</sup> (PQ), Iduvirges Lourdes Muller<sup>2</sup> (PQ), Fátima T.C.R. Guma<sup>3</sup> (PQ)

#### **Abstract**

Titanium and its alloys have been used as prosthesis material due to the corrosion resistance and biocompatibility despite its high friction coefficient and poor wear resistance. Diamond-Like Carbon –(DLC) films have been attracted much interest due to the excellent wear resistance, low friction coefficient, corrosion resistance, biocompatibility and hemocompatibility. In the present work it was studied the corrosion resistance and biocompatibility of titanium and DLC covered titanium samples. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) performed in simulated body fluid environment indicate an increase in the corrosion resistance for samples covered with DLC. The cellular viability was evaluated by the MTT method that indicated the viability.

#### **Resumo**

Titânio e suas ligas vêm sendo muito utilizados como material para próteses devido sua resistência à corrosão e biocompatibilidade, entretanto possuem baixa resistência ao desgaste e alto coeficiente de atrito. Atualmente filmes de carbono do tipo diamante (DLC) tem atraído grande interesse para sua utilização como recobrimento de próteses devido às suas propriedades como a excelente resistência ao desgaste, baixo coeficiente de atrito, resistência à corrosão, bio e hemocompatibilidade. Neste trabalho objetivou-se estudar a resistência à corrosão e biocompatibilidade do titânio puro e deste recoberto por filme de carbono do tipo diamante. Através da técnica de impedância eletroquímica em meio corporal simulado foi constatado, para os filmes DLC depositados sobre titânio, uma melhora na resistência à corrosão que diminui ao passar do tempo de imersão. A determinação da viabilidade celular foi realizada através do teste do MTT, o qual indicou a viabilidade das amostras

**Palavras-chave:** titânio e suas ligas, biomateriais, revestimentos, diamond-like carbon, EIS.

<sup>1</sup> Departamento de Física, UFOP

<sup>2</sup> Departamento de Metalurgia, UFRGS

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, UFRGS

## **Introdução**

---

O presente trabalho apresenta um estudo a respeito de filmes DLC obtidos pela técnica eletroquímica de deposição a partir de dois diferentes líquidos orgânicos, N,N-Dimetilformamida (DMF) e Acetonitrila. Segundo a literatura, filmes DLC obtidos por diferentes técnicas como PVC, CVD, sputtering apresentam propriedades adequadas para uso em aplicações biomédicas, tais como biocompatibilidade e hemocompatibilidade [i-iv]. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resistência à corrosão e a biocompatibilidade dos filmes DLC depositados por eletrodeposição sobre titânio nanoestruturado e comparar com titânio nanoestruturado sem filme. Os materiais foram analisados quanto à sua morfologia através da microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A resistência à corrosão foi avaliada por curvas de polarização e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) em meio corporal simulado e a biocompatibilidade, pelo teste do MTT.

## **Revisão bibliográfica**

---

Materiais biocompatíveis são amplamente utilizados na medicina a fim de restabelecer funções mecânicas e biológicas de algum membro degenerado, o que torna possível uma melhora da qualidade de vida do paciente. Dentre os biomateriais utilizados para tal função, titânio e suas ligas são amplamente utilizados devidos às suas propriedades de resistência à corrosão e biocompatibilidade, entretanto estes biomateriais apresentam uma baixa resistência ao desgaste e alto coeficiente de atrito [v]. Recentemente filmes DLC têm atraído a atenção como material de revestimento para aplicações biomédicas devido às suas propriedades como a excelente resistência à corrosão, baixíssimo coeficiente de atrito, elevada dureza e resistência ao desgaste, natureza bio e hemocompatível [ii].

Filmes DLC têm sido depositados por uma variedade de técnicas como deposição química por vapor (CVD), deposição física por vapor (PVD), íon beam, dentre outras [vi-viii]. A eletrodeposição, técnica menos explorada, vem sendo utilizada para a síntese destes filmes e apresenta vantagens como o baixo custo, não necessita sistema de vácuo, pode ser realizada à temperatura ambiente, etc [ix-xix].

Filmes DLC produzidos pelas técnicas mais utilizadas e exploradas foram testados quanto à sua biocompatibilidade e hemocompatibilidade por diferentes grupos de pesquisa [ii, xx]. Para a avaliação diferentes tipos de células foram cultivadas, tais como: células macrófagas, fibroblastos, osteoblastos, células tronco, etc. Além do estudo in-vitro, estudos in-vivo foram realizados em animais e confirmaram a bio e hemocompatibilidade dos filmes. Filmes obtidos por eletrodeposição ainda necessitam de maiores caracterizações quanto à biocompatibilidade. Assim, o presente trabalho apresenta um estudo a respeito de filmes obtidos através desta técnica.

### **Materiais e Métodos**

Como substrato foram utilizadas placas circulares de titânio puro (ASTM F67 – Grau 1) com diâmetro de 9,5 mm. As amostras foram lixadas com lixas de SiC até grana 2500. Posteriormente as amostras foram eletropolidas em solução de 60 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30 ml HF e 10 ml glicerina a uma densidade de corrente de 0,29 A/cm<sup>2</sup> durante 2 minutos com temperatura controlada entre 5 e 7°C. Após o término, a peça era lavada com água bidestilada e colocada em álcool etílico durante algumas horas para evitar o manchamento da superfície.

A célula utilizada durante as eletrodeposições possuía circulação externa de água para manter a temperatura de deposição de 25°C constante. Um termômetro auxiliar foi colocado para garantir que a temperatura do eletrólito fosse a requerida. A amostra de Ti era colocada em um suporte de teflon que se situava a uma distância aproximada de 4 mm do contra-eletrodo de grafite. Para a eletrodeposição dos filmes de carbono, duas diferentes fontes de carbono foram utilizadas: DMF e acetonitrila. Os revestimentos avaliados foram depositados a um potencial catódico de -1200 V durante 24 horas.

Curvas de polarização foram obtidas com um potenciostato EG&G PAR Modelo 273. Para a impedância eletroquímica a temperatura ambiente nos tempo de 1 h, 7 dias e 16 dias, um equipamento Autolab foi utilizado. As medidas foram realizadas ao potencial de circuito aberto, na faixa de frequência ( $1 \times 10^5$  a  $3 \times 10^{-3}$ ) Hz e com uma perturbação de 10 mV. Os citados ensaios eletroquímicos foram realizados em solução PBS (phosphate buffer saline solution) composta de 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 0,594 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Como

eletrodo de referência utilizou-se eletrodo de calomelano saturado e como contra-eletrodo, platina.

A morfologia dos depósitos foi verificada por microscopia eletrônica de varredura e por microscopia de força atômica operando no modo contato.

Espectroscopia Raman foi utilizada para a caracterização dos filmes obtidos com laser azul (488 nm) de alta resolução através do equipamento NTEGRA Spectra Nanofinder (firma NT-MDT), o qual associa um espectrômetro Raman com um microscópio AFM.

Para a cultura celular, células OCP1, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram mantidas em cultivo em meio (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM) suplementado com 15 % de soro fetal bovino (SFB) e 2g/L de tampão HEPES (pH 7,4) em atmosfera úmida com 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C. Células foram semeadas sobre titânio nanoestruturado e filmes DLC eletrodepositados.

A viabilidade celular foi avaliada através da quantificação da atividade de desidrogenases mitocondriais que reduzem o MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*) formando cristais de derivados formazólicos, insolúveis em água, que precipitam. Os cristais de cor púrpura foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Quanto maior o número de células viáveis, maior é a atividade mitocondrial e mais cristais se formam, resultando em maior absorbância. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas Spectramax M5 da Molecular Devices (570nm e 630nm). A viabilidade das células semeadas nos biomateriais foi comparada com o mesmo número de células mantidas em condições padrão de cultura. Para cálculo do índice de biocompatibilidade a viabilidade das células cultivadas em condição padrão foi considerada igual a 1(um).

Todos os experimentos realizados com células foram realizados em triplicatas. Os resultados apresentados representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (EP). A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via, usando o programa SPSS 15.0 para Windows.

## Resultados e Discussão

Após o eletropolimento do titânio, amostras foram observadas ao AFM e apresentaram estrutura nanoporosa característica de óxido de titânio nanoestruturado. Imagem ao MEV, apresentada na Figura 1, mostra filme DLC depositado sobre o titânio nanoestruturado a partir de DMF. Observa-se que o filme copia a estrutura do substrato, porém apresenta algumas nanotrincas ao centro dos poros. A presença de trincas não foi observada para deposições a partir de acetonitrila.

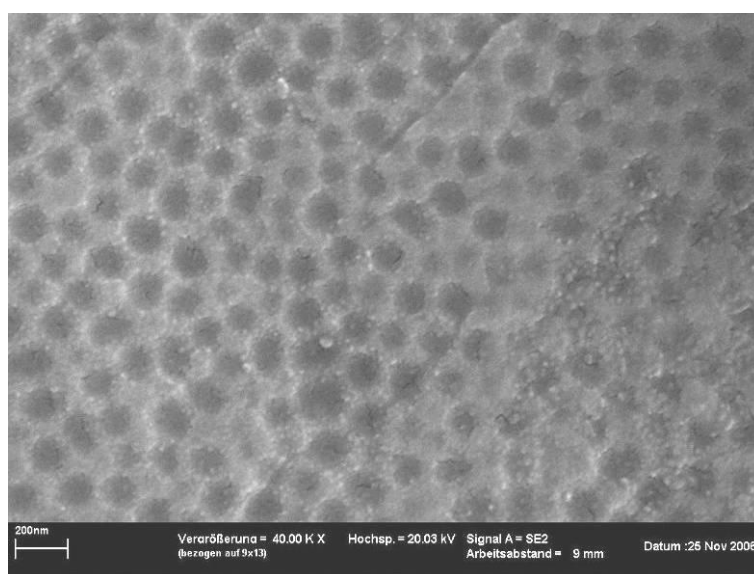


Figura 1. Imagem ao MEV de filme DLC depositado sobre Ti nanoestruturado a partir de DMF. Deposição a potencial de 1200 V, 24 horas e temperatura de 25 °C.

Espectro raman de filme DLC eletrodepositados está apresentado na Figura 2. O espectro revela duas bandas com dois picos localizados em aproximadamente  $1360\text{ cm}^{-1}$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$ , caracterizando os filmes como sendo carbono do tipo diamante (DLC).

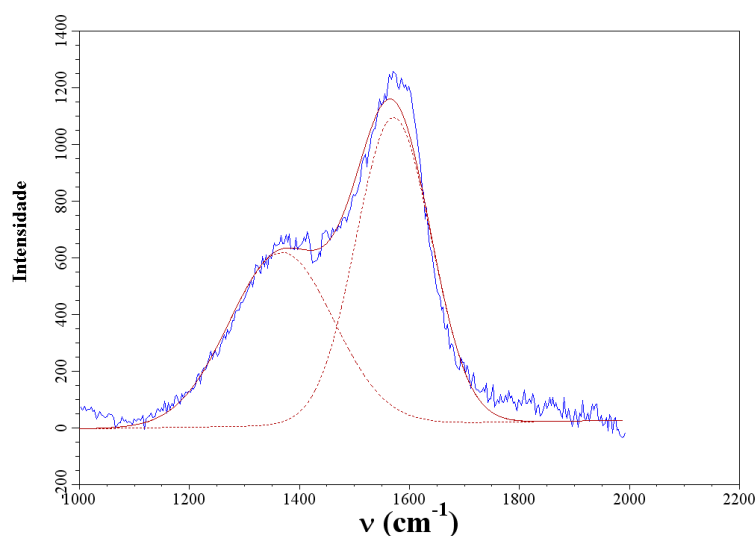


Figura 2. Espectro Raman de filme eletrodepositado.

Curvas de polarização potenciodinâmica em solução PBS para o titânio nu e filmes obtidos a partir de acetonitrila e DMF estão apresentados na Figura 3. Como pode ser verificado, o titânio apresenta uma região de passividade. Filmes DLC obtidos a partir de DMF não trouxeram uma melhora na resistência à corrosão significativa comparado ao titânio nu, o que pode estar relacionado à presença das nanotrincas observadas ao MEV e a possíveis áreas do substrato não recobertas.

Filmes obtidos de acetonitrila produzem uma melhora na resistência à corrosão, com um potencial de corrosão mais nobre, ao redor de 0,1 V e densidades de corrente anódicas menores até um potencial de aproximadamente 0,9 V.

A fim de comparar o desempenho dos filmes de DLC obtidos em acetonitrila e em DMF, foram feitas medidas de EIS do Ti eletropolido com camada de DLC, imerso em solução de PBS durante 1 hora, 7 e 16 dias, como está mostrado na Figura 4. O comportamento do Ti revestido com DLC a partir da acetonitrila mostrou um desempenho anticorrosivo superior ao do Ti revestido com DLC em DMF, com o aumento do tempo de imersão.

Observa-se que o Ti com camada de DLC obtida em DMF apresenta um aumento da definição na separação das constantes de tempo observada no gráfico - ângulo de fase *versus*

$\log f$  ( $f$ , frequência) de 1h para 16 dias de imersão (Fig.4-A e Fig.4-C). As duas constantes de tempo observadas a 10 Hz e 0.1 Hz no Diagrama de Bode da camada de DLC feita em DMF apresentam uma queda nos valores de ângulos de fase de cerca de  $90^\circ$  para  $60^\circ$  e  $68^\circ$ , respectivamente. Isto caracteriza uma camada de DLC com comportamento eletroquímico diferenciado do observado inicialmente com 1 hora de imersão, indicando possivelmente uma superfície pela qual o eletrólito permeia através das trincas mostradas na Figura 2, apresentando uma menor resistência aos processos de difusão. A resistência a baixa frequência também diminuiu substancialmente com o tempo para o material revestido em DMF, corroborando sua pior performance quando comparado com aquele revestido em acetonitrila.

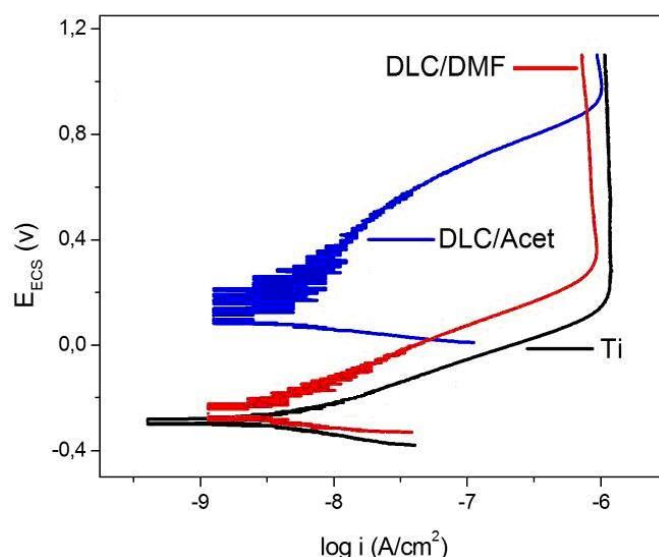


Figura 31. Curvas de polarização potenciodinâmica realizada em solução PBS para Ti eletropolido e filmes DLC depositados, a partir de acetonitrila e DMF, sobre Ti eletropolido. Velocidade de varredura: 0,166 mV/s.

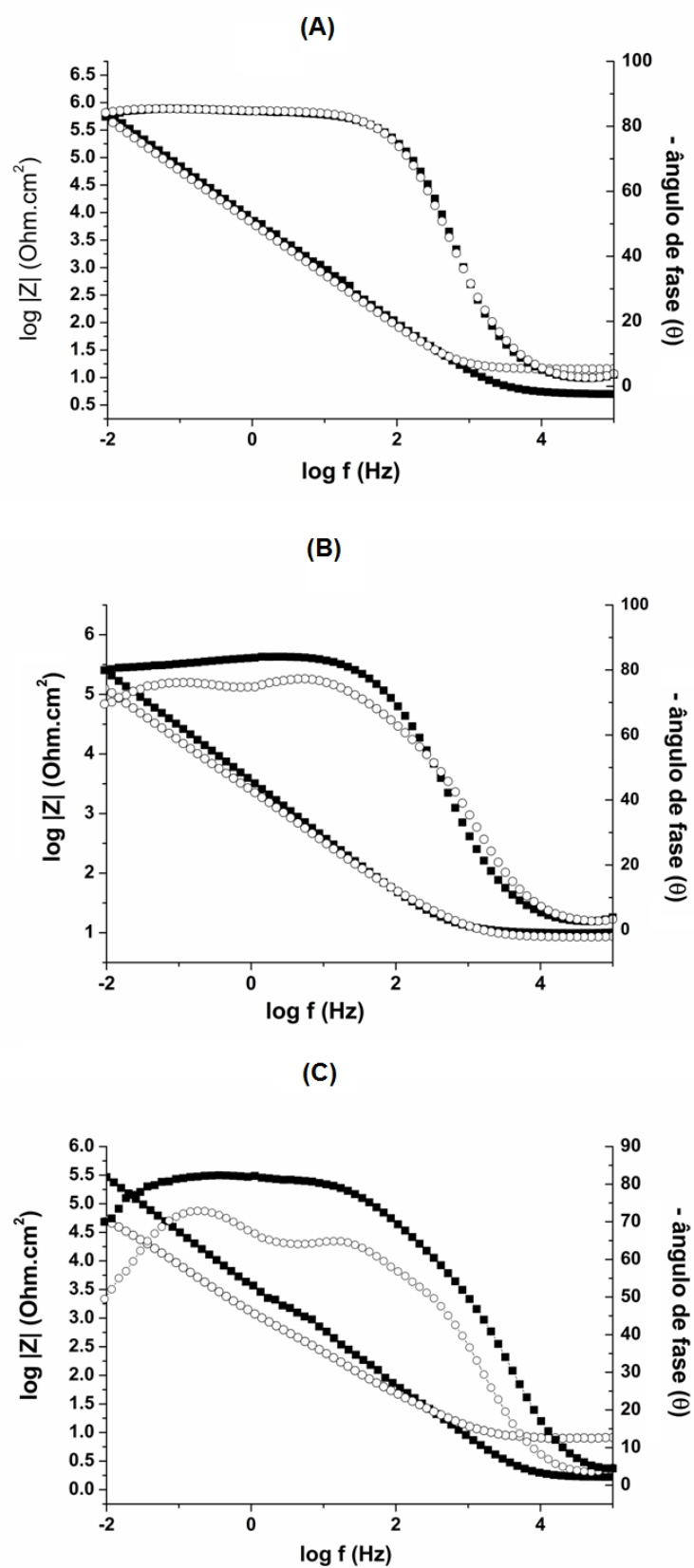
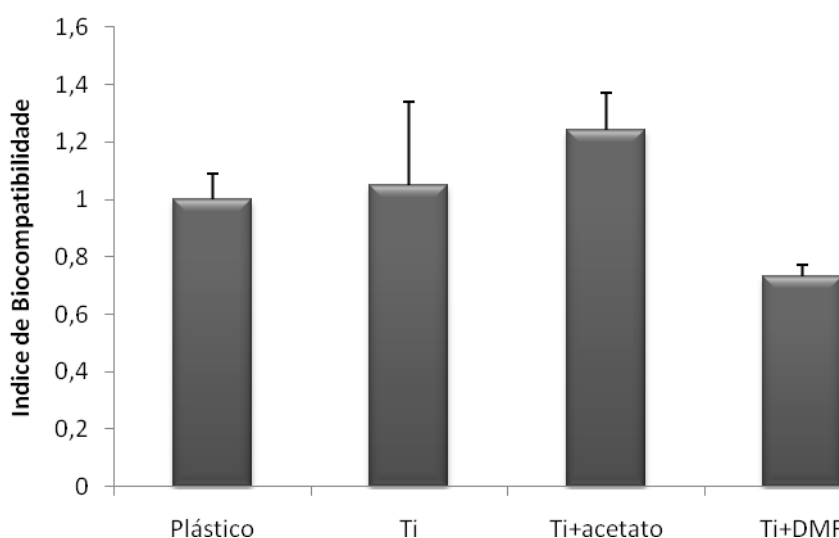


Figura 4: Diagrama de Bode de Ti eletropolido com revestimento de DLC feito em DMF (○)



e em acetonitrila (■) imerso em solução de PBS por 1 h (A), 7 dias (B) e 16 dias (C).

A biocompatibilidade dos diferentes materiais: Ti nanoestruturado, Ti nanoestruturado recoberto com DLC obtido a partir de acetonitrila e a partir de DMF, foi determinada pela comparação entre a viabilidade das células semeadas sobre esses materiais e a viabilidade do mesmo número de células cultivadas pelo mesmo tempo em condições padrão (sobre plástico), utilizando-se o método do MTT.



**Figura 5: Índice de Biocompatibilidade.** Para o cálculo da biocompatibilidade dos diferentes biomateriais, a viabilidade das células cultivadas sobre plástico (condições padrão) foi considerada igual a 1 (um). O experimento foi realizado como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  EP.

Como apresentado na Figura 5, não foi encontrada diferença significativa entre as células cultivadas sobre plástico e as células cultivadas sobre os diferentes biomateriais, confirmando a biocompatibilidade dos filmes DLC obtidos por eletrodeposição. Verificou-se apenas uma tendência, que não é estatisticamente significativa, de diminuição de viabilidade nas culturas realizadas sobre DLC depositado a partir de DMF. Cabe ressaltar que estes mesmos filmes apresentaram uma menor resistência à corrosão tanto nos testes de polarização quanto nos testes de impedância eletroquímica.

## Conclusões

---

Camadas de DLC foram eletrodepositadas eficientemente a partir de acetonitrila e DMF sobre Ti, conforme mostram picos localizados em aproximadamente  $1360\text{ cm}^{-1}$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$  em espectros Raman. Os resultados de polarização potenciodinâmica concordam com os resultados obtidos de EIS no sentido de que o filme de DLC obtido em acetonitrila tem um desempenho superior à corrosão comparado aos filmes obtidos a partir de dimetilformamida.

Tal comportamento possivelmente está relacionado à presença de trincas no filme de DLC obtido em DMF.

Ti revestido com filmes obtidos a partir de acetonitrila apresentou a melhor combinação de biocompatibilidade (como mostrado pela técnica do MTT) e resistência à corrosão dentre os materiais testados.

## Agradecimentos

---

À FAPEMIG, CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## Referências bibliográficas

---

- 
- [i] Aisenberg, S.; Chabot, R. Ion-Beam Deposition of Thin Films of Diamond-like Carbon. **Journal of Applied Physics**, v. 42, p. 2953-2958, 1971.
  - [ii] Hauert, R. A review of modified DLC coatings for biomedical applications. **Diamond and Related Materials**, v. 12, p. 583-589, 2003.
  - [iii] Hollman, P. et al. Tribological evaluation of thermally activated CVD diamond-like carbon (DLC) coatings. **Surface and Coatings Technology**, v. 96, p. 230-235, 1997.
  - [iv] Liu, C.L.; Chu, P.K.; Yang, D.Z. *In vitro* evaluation of diamond-like carbon coatings with a Si/SiC<sub>x</sub> interlayer on surgical NiTi alloy. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 257, p. 132-135, 2007.

- 
- [v] Manhabosco, T.M.; Muller, I.L. Tribocorrosion of Diamond-Like Carbon Deposited on Ti6Al4V. **Tribology Letters**, v. 33, p. 193-197, 2009.
- [vi] Staryga, E.; Bak, G.W. Relation between physical structure and electrical properties of diamond-like carbon thin films. **Diamond and Related Materials**, v. 14, p. 23-34, 2005.
- [vii] Voevodin, A. A.; Donley, M. S. Preparation of amorphous diamond-like carbon by pulsed laser deposition: a critical review. **Surface and Coatings Technology**, v. 82, p.199–213, 1996.
- [viii] Martin, P; J.; Bendavid, A. Review of the filtered vacuum arc process and materials deposition. **Thin Solid Films**, v. 394, p. 1-15, 2001.
- [ix] Manhabosco, T.M.; Muller, I.L. Electrodeposition of diamond-like carbon (DLC) films on Ti. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 4082-4086, 2009.
- [x] Zhu, H. et al. Deposition of diamond-like carbon films by electrolysis of methanol solution. **Applied Physical Letters**, v. 69, n. 8, p. 1074-1076, 1996.
- [xi] Cai, K. et al. Evaluation of diamond-like carbon films deposited on conductive glass from organic liquids using pulsed current. **Surface and Coatings Technology**, v. 130, p. 266-273, 2000.
- [xii] Zhu, H. et al. Liquid deposition of hydrogenated carbon films in N,N-dimethylformamide solution. **Materials Letters**, v. 41, p. 63-66, 1999.
- [xiii] Fu,Q. et al. Attempt to deposit carbon nitride films by electrodeposition form an organic liquid. **Physical Review B**, v. 59, n. 3, p. 1693-1695, 1999.
- [xiv] Cao, C.; Zhu, H.; Wang, H. Electrodeposition diamond-like carbon films from organic liquids. **Thin Solid Films**, v. 368, p. 203-207, 2000.
- [xv] Fu, Q. et al. Electrodeposition of carbon films from various organic liquids. **Surface and Coatings Technology**, v. 124, p. 196-200, 2000.
- [xvi] Zhu, H. et al. Electrodeposition of diamond-like amorphous carbon films on aluminum from acetronitrile. **Applied Physics A**, v. 71, p. 227-228, 2000.
- [xvii] Guo, D. et al. Evaluation of diamond-like carbon films electrodeposited on na Al substrate from the liquid phase with pulse-modulates power. **Carbon**, v. 39, p. 1395-1398, 2001.
- [xviii] Jiu, J.-T. et al. Deposition of diamond-like carbon films by using liquid phase electrodeposition technique and its electron emission properties. **Journal of Material Science**, v. 36, p. 5801-5804, 2001.
- [xix] Zhu, H.S. et al. Aroused problems in the deposition of diamond-like carbon films by using the liquid phase electrodeposition technique. **Journal of Materials Science**, v. 38, p. 141-145, 2003.
- [xx] Ma, W.J. et al. DLC coatings: Effects of physical and chemical properties on biological response. **Biomaterials**, v. 28, p. 1620-1628, 2007.