



Estudo da Biocorrosão de Filmes de TiO₂NT sintetizados eletroquimicamente: efeito do tratamento térmico

Study of Electrochemically Synthesized TiO₂NT Films Biocorrosion: Annealing Effect

Taila Sabrina Mazzucatto*, Mariana de Souza Sikora[†],

Anna Paulla Simon[‡]

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo analisar e comparar o comportamento eletroquímico dos filmes de TiO₂ em fluido corporal simulado e a corrosão causada pelas diferentes bactérias. Utilizam-se filmes de titânio sintetizados com 10 minutos e tratados termicamente. Para a adesão microbiana os *coatings* de TiO₂ foram imersos em soluções contendo a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922), por um período de 6 horas. Após o tempo de imersão, a bactéria aderida a superfície foi retirada em vórtex com solução salina. Para o estudo dos parâmetros eletroquímicos, empregou-se a técnica de potencial de circuito aberto e análise de polarização potenciodinâmica. Os resultados obtidos demonstraram que filmes submetidos a tratamento térmico não apresentam resultados relevantes para os diferentes meios em que foram submetidas.

Palavras-chave: *coatings* de TiO₂, adesão microbiana, corrosão, curva de Tafel.

ABSTRACT

The present work aimed to analyze and compare the electrochemical behavior of TiO₂ films in simulated body fluid and the corrosion caused by different bacteria. Titanium films synthesized with 10 minutes and heat treated are used. For microbial adhesion, TiO₂ coatings were immersed in solutions containing the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and the Gram-negative *Escherichia coli* (ATCC 25922), for a period of 6 hours. After the immersion time, the bacteria attached to the surface were vortexed with saline solution. To study the electrochemical parameters, the open circuit potential technique and potentiodynamic polarization analysis were used. The results obtained showed that films submitted to heat treatment do not present relevant results for the different media in which they were submitted.

Keywords: *coatings* de TiO₂, microbial adhesion, corrosion, Tafel curve.

1 INTRODUÇÃO

Biomateriais metálicos de titânio e suas ligas vem sendo usados há mais de 30 anos em implantes odontológicos e ortopédicos, devido às suas excelentes propriedades, como resistência a corrosão, elasticidade, molhabilidade e a substituição de tecidos duros, como os ossos (SILVA; GUERRA, 2020). A superfície dos materiais metálicos a base de Titânio é bio-inerte e não interage diretamente com o tecido ósseo por ligações químicas. Para que possa atender a demanda clínica e obter um implante com maior biocompatibilidade, a modificação da superfície desses metais é de extrema importância. Uma série de conjuntos e técnicas são

* Química Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil; tailamazucatto@alunos.utfpr.edu.br

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco; marianasikora@utfpr.edu.br

[‡] Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, Paraná, Brasil; anna17simon@gmail.com



empregadas atualmente para que essa modificação na superfície possa ocorrer, como implantação iônica de imersão de plasma, pulverização de plasma, sol-gel, anodização, dentre outras (HE; ZHANG, 2017).

Os nanotubos de óxido de titânio (TiO₂NTS) formados pela anodização sob condições apropriadas apresentam inúmeras propriedades favorecendo os implantes. Esse material vem se destacando para aplicações de uso prolongado, como os implantes, principalmente em próteses de quadril e implantes dentários. A alta resistência que esses filmes possuem à corrosão se deve a formação de um óxido estável em sua superfície através da anodização. O óxido formado também favorece a deposição de um material bioativo, como a hidroxiapatita, a qual possui propriedades de biocompatibilidade e osseointegração (ZANIOLO, 2014).

Além da adesão das células, como osteoblastos, podem ser aderidas na superfície outras células como as bacterianas. Essa adesão forma biofilmes sobre os *coatings* induzindo a corrosão da superfície? Isto pode ocorrer devido ao acúmulo de ácidos orgânicos sobre a superfície dos filmes gerando um ambiente mais ácido.

As bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Gram-positiva), são continuamente encontradas em infecções, causando dores e produzindo inflamações na área implantada. A presença dessas bactérias na superfície metálica forma um biofilme promovendo a colonização sobre o implante. As colônias formadas por essas bactérias sobre os implantes causam diversas complicações, requerendo cirurgias de revisão e internações mais longas (ZHANG; ZHANG, 2008) (SILVA; GUERRA, 2020).

O objetivo desse estudo foi comparar os efeitos do biofilme bacteriano no comportamento eletroquímico de filmes de TiO₂ (tratados ou não termicamente) frente as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

2 MÉTODO

2.1 Síntese anódica

A anodização dos filmes seguiu as metodologias adaptadas de (FERREIRA; SIMON, 2019). Para a síntese anódica foram utilizadas placas de Ti ASTM F67 (Titânio comercialmente puro) de 3,0 cm² de área total, os quais foram lixados com Micro Retífica Elétrica (AR172 230V– 130W) e lixas de carbetto de silício 1200 mesh para a remoção de toda óxido presente na superfície (SIMON; SANTOS, 2019).

Para a anodização foi empregada a técnica potenciostática, com potencial constante de 40 V por 10 minutos a 40 °C. Duas placas de platinas foram usadas como contra-eletrodos e o filme Ti-6Al-4V como eletrodo de trabalho. A variação de corrente elétrica foi medida por um multímetro (8846A Fluke). A solução eletrolítica usada foi composta por 90 % v/v de etilenoglicol, 9 % v/v de água, 1% v/v de *Simulated Body Fluid* (SBF) e 0,75 % m/m fluoreto de amônio. O SBF utilizado para o preparo da solução seguiu a metodologia de Kokubo (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). Os dados foram coletados pelo programa FlukeView Forms Basic.

Para avaliação do efeito do tratamento térmico, 9 filmes foram levados para a estufa com rampa de aquecimento de 2 °C por minutos até 450 °C. Após 2 horas nesse patamar, os filmes foram resfriados progressivamente até a temperatura ambiente.

2.1 Adesão microbiana

As amostras anodizadas e tratadas termicamente foram destinadas aos testes de adesão microbiana, utilizando-se a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922), mediante o seguinte procedimento:



O inóculo foi preparado transferindo algumas colônias da bactéria crescida em meio BHI, em 40 mL, e levados para estufa bacteriológica por 14 - 16 h a 37 °C. A padronização foi feita em escala Mc Farland e diluída em BHI, para uma concentração final de 10^5 UFC mL⁻¹.

O estudo da atividade antimicrobiana seguiu a metodologia adaptada de Zhao (ZHAO; WANG, 2011), 5 mL do inóculo diluído foi adicionado em cada tubo Falcon contendo os filmes de TiO₂ e incubados a 37 °C por 6 horas. Os filmes foram esterilizados em luz UV durante 30 minutos cada face. Filmes de titânio metálico foram utilizados como branco. As amostras foram nomeadas de acordo com as condições de síntese e ao tipo de bactéria a qual foram expostas, de acordo com o Quadro 1.

Após 6 horas, as amostras foram lavadas com água destilada e transferidas para tubos Falcon contendo 5 mL BHI e agitados em vórtex por 5 minutos para que toda célula aderida ao filme fosse despreendida completamente. Após esse período, uma alíquota de 1 mL desta solução foi retirada e diluída serialmente em tubos contendo solução salina estéril 0,9%. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL de cada tubo Falcon foi plaqueado em ágar Plate Count Agar (PCA) em triplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 16 horas.

Após a incubação, foi realizada a contagem do número de colônias formadas e o resultado foi expresso em UFC mL⁻¹. Para avaliar a adesão das bactérias sobre os filmes de TiO₂ determinou-se a significância estatística por análise de variância uni-fatorial (ANOVA) usando nível de confiança de 95% com teste de significância (do inglês, *Honest Significance Test - HSD*) *post-hoc* de Tukey.

Quadro 1 – Nomenclatura das amostras.

Nomenclatura	Definição
TSAT	Filme anodizado e tratado termicamente frente a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>
TSA	Filme anodizado frente a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>
PSA	Filme puro frente a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>
TECT	Filme anodizado e tratado termicamente frente a bactéria <i>Escherichia coli</i>
TEC	Filme anodizado frente a bactéria <i>Escherichia coli</i>
PEC	Filme puro frente a bactéria <i>Escherichia coli</i>

Fonte: A autoria própria (2021).

2.2 Parâmetros eletroquímicos

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando o Potenciostato EmStat 3+/PalmSens. As medições foram realizadas em sistema convencional composto por três eletrodos em solução *Phosphate Buffered Saline* (PBS) a 37 °C, como eletrodo de trabalho utilizou-se amostras com aproximadamente 3,0 cm² expostas, como contra-eletrodo utilizou-se uma placa de platina e como eletrodo de referência Ag/AgCl.

Para o estudo da estabilidade termodinâmica dos filmes de TiO₂ foi empregada a técnica do potencial de circuito aberto (Eoc) e a polarização potenciodinâmica. A polarização potenciodinâmica foi realizada com a aplicação de um potencial variável após a estabilização do sistema. O potencial aplicado variou de 500 µV acima e abaixo do potencial de corrosão, usando uma taxa de varredura de 0.001 mV/s, todos os testes foram realizados em duplicatas.

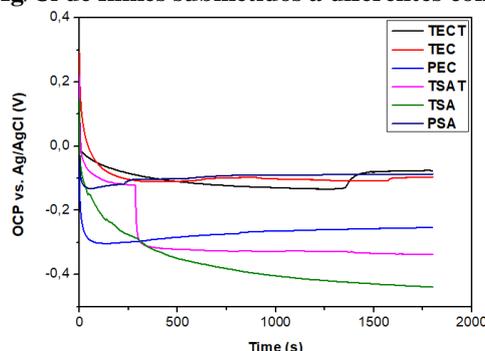
3 RESULTADOS

O ensaio eletroquímico de Eoc e polarização potenciodinâmica foram realizados a fim de comparar a resistência a corrosão das superfícies dos filmes tratados e não tratados termicamente após 6 horas de imersão em solução bacteriana.

Nos primeiros minutos de medição do OCP observa-se a estabilização do sistema, conforme representado na Fig. 1. Em seguida ao processo de estabilização, é possível perceber que para os filmes puros, as curvas apresentaram um leve crescimento positivo com o tempo de imersão, o que indica a formação de um filme passivo na superfície da amostra. A formação desse filme faz com que o processo anódico controle o processo do eletrodo, levando ao deslocamento para valores mais positivos de potencial.

A amostra TSAT apresentou uma variação de potencial após os 30 minutos de ensaio, um OCP mais negativo quando comparado com as outras amostras anodizadas e tratadas termicamente. Essa variação de potencial para valores mais negativos indica que o filme é mais susceptível a corrosão, devido a dissolução do óxido formado sobre a superfície do mesmo (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011). Já as amostras TEC, TECT e PSA, obtiveram um potencial estável até o fim da medição, e maiores valores de OCP, indicando a presença de uma camada de TiO_2 protetiva e menos propícia a corrosão em relação às demais amostras.

Figura 1 – OCP vs. Ag/Cl de filmes submetidos a diferentes condições de tratamento.

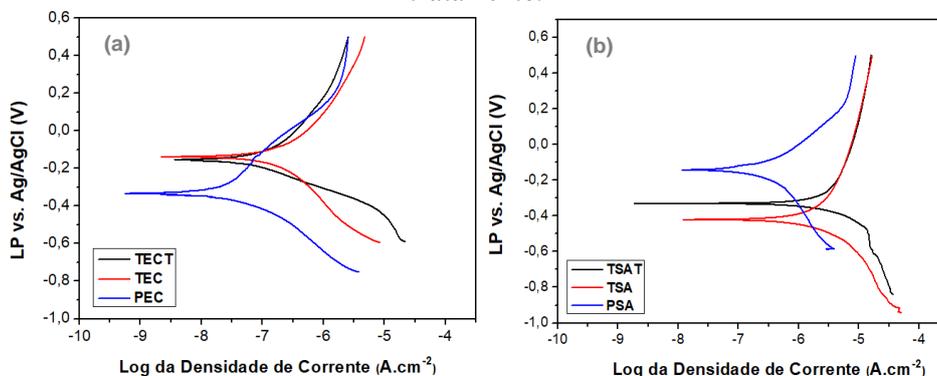


Fonte: Autoria própria (2021).

O resultado do teste de polarização potenciodinâmica indica que o filme imerso em *Staphylococcus aureus* submetido a síntese anódica, apresentou uma maior taxa de corrosão (-0,431 V), correspondendo a degradação do filme protetor presente na superfície, Fig. 2 (b). Em análise ao Quadro 2 é possível observar que o parâmetro Ecor é distinto para as três condições de sínteses, aonde a amostra de Ti puro apresenta valores mais nobres para os parâmetros de corrosão, indicando que a mesma é mais resistente a corrosão quando comparadas a amostra anodizada e tratadas termicamente.

Na Figura 2 (a), observa-se que para os filmes frente a bactéria *Escherichia coli* a curva referente a amostra anodizada, apresenta deslocamento para a região mais positiva do gráfico e uma menor densidade de corrente, indicando que o mesmo é mais resistente quando em contato com meio corrosivo, sendo confirmado pelos dados estatísticos apresentados no Quadro 2. Por outro lado, o filme PEC demonstra ser mais susceptível a corrosão, sua curva obteve valores que tendem a região mais negativa do gráfico. Já a amostra tratada termicamente não apresentou valores expressivos, porém, apresenta melhores resultados quando comparada ao filme puro.

Figura 2 – Curvas de polarização potenciodinâmica para filmes submetidos a diferentes condições de tratamento.



Fonte: Autoria própria (2021).

Em comparação aos dois gráficos, é possível perceber que ambos apresentaram resultados opostos em relação aos filmes puros e submetidos a síntese anódica. O filme PSA demonstra ser mais resistente a corrosão, quando a amostra anodizada apresenta resultados que tendem a região mais negativa, sendo menos resistente a meios corrosivos. De acordo com a Fig. 2 (b), a curva para a amostra tratada termicamente também não demonstrou resultados relevantes, indicando que o filme tratado termicamente frente a bactéria *Staphylococcus aureus* não apresenta alta taxa de corrosão, porém, apresentando resultados mais satisfatórios do que o filme de titânio puro. Extrapolando as curvas de polarização por meio da equação de Tafel, foi possível obter os valores de Ecor, Icor, resistência a polarização (PR) e a corrosão por ano (mm/ano).

Quadro 2 – Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir do ensaio de corrosão.

	TECT	TEC	PEC
Ecor, V	-0,21 ± 0,08 ^a	-0,14 ± 0,01 ^a	-0,34 ± 0,07 ^a
Icor, µA	2,4 ± 0,3 ^a	2,31 ± 0,12 ^a	4,7 ± 6,5 ^a
Icor, mA/cm²	4,00E-6 ± 0,00E+00 ^a	4,00E-6 ± 0,00E+00 ^a	9,00E-6 ± 1,25E-5 ^a
Pol Resistance (MΩ)	2,85E+4 ± 1,77E+4 ^a	7,04E+4 ± 2,63E+4 ^a	5,26E+5 ± 7,26E+5 ^a
Corr rate (mm/ano)	0,143 ± 0,005 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,3 ± 0,4 ^a
	TSAT	TSA	PSA
Ecor, V	-0,328 ± 0,003 ^b	-0,43 ± 0,02 ^c	-0,146 ± 0,006 ^a
Icor, µA	34,8 ± 2,9 ^a	23 ± 6 ^a	3,9 ± 1,4 ^b
Icor, mA/cm²	6,00E-6 ± 2,00E-6 ^a	4,50E-5 ± 9,00E-6 ^a	6,50E+00 ± 9,00E-6 ^a
Pol Resistance (MΩ)	3,6E+3 ± 59,4 ^b	6E+3 ± 250 ^a	4,41E+4 ± 9,16E+3 ^a
Corr rate (mm/ano)	2,2 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,4 ^a	0,2 ± 0,1 ^b

*Letras sobrescritas referem-se aos resultados da ANOVA. Valores que compartilham da mesma letra são estatisticamente equivalentes.

Fonte: Autoria própria (2021).

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o filme puro frente a bactéria *Staphylococcus aureus*, apresentou valores mais nobres para Ecor, diferentemente do filme submetido a síntese anódica, o qual demonstra ser mais susceptível a corrosão.



Os filmes frente a bactéria *Escherichia coli* apresentaram resultados opostos aos da bactéria Gram-positiva, o filme de titânio puro demonstra ser menos resistentes a corrosão, já a amostra anodizada tende a região mais positiva do gráfico, indicando uma melhora na biocompatibilidade e também uma ótima resistência a corrosão.

Para ambos os gráficos, os filmes de titânio tratados termicamente não apresentaram resultados expressivos, ambas as curvas se mantiveram entre os valores das demais amostras, indicando que filmes puros e anodizados dependendo do meio em que são imersos, demonstram ser menos resistentes a corrosão.

Com esse estudo, esperava-se que os filmes puros apresentassem maiores característica a corrosão em relação as amostras submetidas a anodização e tratamento térmico, já que o óxido formado pela anodização apresenta algumas características únicas as quais o filme nativo não possui, como o aumento na área superficial permitindo uma maior adesão, migração celular e uma melhor proliferação. A síntese anódica pode ter favorecido a adesão das bactérias sobre a superfície dos filmes, sendo eles mais propensos a corrosão.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UTFPR campus Pato Branco, ao Laboratório Central de Análises (CA-PB) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio ao projeto de pesquisa, possibilitando a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- SILVA, Daniela; GUERRA, Carolina; et al. **The effect of *Staphylococcus aureus* on the electrochemical behavior of porous Ti-6Al-4V alloy**. *Bioelectrochemistry*. v. 136, 2020.
- HE Xiaojing; ZHANG Guannan; et al. **Biocompatibility, corrosion resistance and antibacterial activity of TiO₂/CuO coating on titanium**. *Ceramics International*. v. 43, p. 16185-16195, 2017.
- ZANIOLO, Karina Marchi. **Crescimento anódico e caracterização de óxidos coloridos de titânio em eletrólitos alternativos**. São Paulo, 2014.
- ZHANG, Fan; ZHANG, Zhengbiao; et al. **Silk-functionalized titanium surfaces for enhancing osteoblast functions and reducing bacterial adhesion**. *Biomaterials*. v. 29, p. 4751-4759, 2008.
- SIMON, Anna Paulla; SANTOS, Vidiany Aparecida Queiroz; et al. **Enhancement of Mechanical Properties and Wettability of TiO₂NT Arrays Formed in Simulated Body Fluid-Based Electrolyte**. *Advanced Engineering Materials*. v. 12, 2019.
- FERREIRA, Carlise Hannel; SIMON, Anna Paulla; et al. **Nanotexturization of Ti-based implants in simulated body fluid: Influence of synthesis parameters on coating properties and kinetics of drug release**. Cambridge University, 2019.
- OLIVEIRA, Paula César; BERTAZOLLI, Rodnei. **Determinação da densidade de corrente de corrosão em meios de baixa condutividade: uso de microeletrodos para minimizar a queda ôhmica**. Química Nova. São Paulo, 2011.
- KOKUBO, Tadashi; TAKADAMA, Hiroaki. **How Useful is SBF in Predicting in vivo Bone Bioactivity?**. *Biomaterials*. v. 27, p.2907-2915, 2006.
- ZHAO, Lingzhou; WANG, Hairong, et al. **Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles**. *Biomaterials*. v. 32, p. 5706-5716, 2011.
- ROY, Poulomi; BERGER, Steffen; SCHMUKI, Patrik. **TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications**. *Angewandte Chemie International Edition*. v. 50, n. 13, p. 2904-2939, 2011.