

Caracterização físico-química de nanopartículas de dióxido de titânio para produção de nanocompósitos¹

Davi Glanzmann^{2,3}, Leonara Fayer⁴, Rafaella S.S. Zanette⁵, Juliana C. Gern⁶, Luiz F.C. de Oliveira⁷, Michele Munk⁴, Humberto de Mello Brandão^{6,8}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (processo nº 405030/2015-0); da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais –FAPEMIG. Parte da tese de doutorado do segundo autor, bolsista da CAPES.

²Bolsista de Iniciação Científica com fomento do CNPq

³Graduando em Biologia – UFJF. e-mail: davi.glanz@gmail.com

⁴Departamento de Ciências Biológicas da UFJF: leonara.fayer@icb.ufjf.br; michele.munk@icb.ufjf.br

⁵Bolsista de Pós-doutorado CNPq: rafaellazanette@gmail.com

⁶Pesquisador, Embrapa Gado de Leite: juliana.gern@embrapa.br; humberto.brandao@embrapa.br

⁷Departamento de Química da UFJF: luiz.oliveira@uff.edu.br

⁸Orientador

Resumo: A percepção de que animais também sentem medo dor e angústia leva a necessidade de desenvolvimento de inúmeros métodos alternativos ao uso de animais em experimentação. Assim, métodos *in vitro* são uma alternativa para contornar este problema. Baseado em sua biocompatibilidade e sua baixa toxicidade, as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂NPs) apresentam grande potencial para serem utilizadas na produção de desenvolvimento de matrizes 3D para a bioengenharia de tecidos. Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar físicoquimicamente TiO₂NPs para em um futuro utilizá-las para produção de nanocompósitos. Para tanto, TiO₂NPs (NM01001a, European Union reference material) foram caracterizadas por técnicas espectroscópica (Raman e Infravermelho), bem como por microscopia de força atômica e espalhamento dinâmico de luz. As TiO₂NPs apresentaram geometrias e tamanhos heterogêneos, contudo apresentando pelo menos um dos eixos cardinais com tamanho inferior a 100nm, elevado Índice de Dispersão (0,526 ± 0,05) e baixa estabilidade coloidal (potencial Zeta de -3,50 ± 0.40 mV). Por sua vez, o material apresentou indicativo de elevado grau de pureza, com bandas características de ligações de Ti-O e grupos OH na superfície da partícula, respectivamente em 542 e 686 cm⁻¹ 3427 cm⁻¹ na espectroscopia e infravermelho e 639, 517 e 395 cm⁻¹ espectroscopia Raman. Baseado nos resultados encontrados, pode-se concluir que as TiO₂NPs apresentam elevado grau de pureza e caráter nanométrico com formato heterogêneo. Baseado em dados de literatura que relatam toxicidade em função da forma de nanopartículas, recomenda-se a realização de mais estudos de toxicidade antes de seu uso em nanocompositos destinados a bioengenharia.

Palavras-chave: Nanopartícula; dióxido de titânio; caracterização; nanocompósito

Physicochemical characterization of titanium dioxide nanoparticles for nanocomposites production

Abstract: The perception that animals are also afraid of pain, suffering and distress in animal experiments leads to the need to develop alternative methods to animals use. Thus, *in vitro* methods are an alternative to get around this problem. Based on its biocompatibility and low toxicity, titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) have great

potential to be used in the development of 3D matrices for tissue bioengineering. In this context, the present work aims to do the physicochemical characterization of TiO₂NPs to use them in the future to produce nanocomposites. For this purpose, TiO₂NPs (NM01001a, European Union reference material) were characterized by spectroscopic techniques (Raman and Infra-Red), as well as by Atomic Force Microscopy and Dynamic Light Scattering. The TiO₂NPs have heterogeneous geometries and sizes, with at least one of the cardinal axes with a size less than 100nm, high Dispersion Index (0.526 ± 0.05), and low colloidal stability (Zeta potential of -3.50 ± 0.40 mV). In turn, the material presented is indicative of a high degree of chemical purity, with characteristic bands of Ti-O bonds and OH groups on the particle surface, respectively at 542 and 686 cm⁻¹ and 3427 cm⁻¹ in infrared spectroscopy and 639, 517 and 395 cm⁻¹ Raman spectroscopy. Based on the results, it can be concluded that the TiO₂NPs have a high degree of purity and heterogeneous shape/nanometric size. Based on literature data, that reported toxicity as a function of the form of nanoparticles, it is recommended to carry out further toxicity studies before their use in bioengineering nanocomposites.

Keywords: Nanoparticle; titanium dioxide; characterization; nanocomposite

Introdução

As novas legislações e a conscientização de que animais possuem sentimentos e que os estudos toxicológicos *in vivo* podem provocar dor, ansiedade, medo, angústia e pânico nos animais, estimulou nas últimas décadas o desenvolvimento de inúmeros métodos alternativos *in vitro* para a realização destes estudos.

Nesse contexto, o desenvolvimento de matrizes 3D aplicadas à cultura de células-tronco mesenquimais são importantes para futuras aplicações em bioengenharia tecidual e testes de segurança de novos medicamentos. Para esse fim, hidrogéis poliméricos (nanocompósitos) baseados em polissacarídeos surgiram como uma opção promissora para a bioengenharia de tecidos visto que contribuem como suporte 3D para o crescimento e diferenciação celular e para a liberação de moléculas moduladoras da matriz extracelular (MEC). Esses biomateriais possuem biocompatibilidade e similaridade física com as do tecido vivo e são capazes de absorver grande quantidade de água devido a presença de grupos hidrofílicos (DAVE & GOR, 2018). Além disso, os hidrogéis também podem ser modificados química e fisicamente para mimetizar os tecidos vivos, de modo que se tornem mais bioativos e melhorem seu desempenho *in vivo* (TAIRA et. al., 2018).

Contudo, hidrogéis produzidos apenas com polissacarídeos apresentam propriedades mecânicas fracas, reduzida taxa de difusão de nutrientes e ineficiente bioatividade para indução e formação da matriz inorgânica do tecido ósseo (DAVE & GOR, 2018). Para superar essas limitações, os hidrogéis de quitosana podem ser reforçados com nanomateriais (NM) gerando os nanoscaffolds, e dessa maneira promover o aumento da porosidade, estabilidade mecânica, capacidade de inchamento, encapsulação de biomoléculas, bem como facilitar a aderência celular (SOUNDARYA et al., 2018).

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo realizar a caracterização físico-química de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) para no futuro utilizá-lo como potencial indutor de diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSCs) em scaffolds.

Material e Métodos

Para o experimento foram utilizadas nanopartículas dióxido de titânio (TiO₂NPs) fornecidas pelo NanoReg, as quais são materiais de referência (NM01001a, European Union). Para todas as análises, as TiO₂NPs (1000 µg / ml) foram dispersas em meio aquoso com auxílio de um sonificador marca Branson Sonifier S-450 (Branson Sonifier S-450, EUA) a 400Watts por 16 min, com base nas orientações de dispersão para ensaios de genotoxicidade de NANoREG.

A composição química do TiO₂NP foi avaliada usando o espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier Bomem (FTIR) MB-102 (Bomem, Canadá). A análise foi realizada na região de 4000 a 200 cm⁻¹ usando pastilhas de KBr previamente secas a 500°C. As mensurações Raman foram realizadas em um espectrômetro Bruker RFS 100 (Bruker, EUA) excitado com um laser Nd+3/YAG a 1064 nm, equipado com detector InGaAs resfriado por nitrogênio líquido. Os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm⁻¹, e uma média de 512 varreduras foi coletada com uma potência do laser de 80 mW.

O raio hidrodinâmico e o potencial Zeta foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) com auxílio equipamento Malvern 3000 Zetasizer NanoZS (Malvern, Reino Unido).

Finalmente, a análise morfologia do nanomaterial foi avaliada usando Microscópio de Força Atômica (AFM) (Nanosurf EasyScan 2, Nanosurf Instruments, Suíça), com auxílio de uma ponta de prova em oscilação livre de 50 mV, e área de varredura da sonda de 5 × 5µm.

Resultados e Discussão

Ao avaliar o espectro infravermelho do TiO₂NP, foram identificadas três bandas, uma em 542 e 686 cm⁻¹, associada à vibração das ligações Ti-O, o que indica que se trata de um dióxido de titânio; uma banda em 3427 cm⁻¹, que sugere superfícies hidroxiladas, a qual pode ser causada pelas interações de hidrogênio entre grupos OH da superfície do dióxido de titânio com oxidação +2 e água molecular; interações, estas, corroboradas com vibrações localizadas em 1630 cm⁻¹ (DAVE & GOR, 2018). As bandas observadas no espectro Raman obtido em 639, 517 e 395 cm⁻¹ podem ser atribuídas a B1g, A1g / B1g e Eg, todas associadas ao TiO₂ (DAVE & GOR, 2018).

As imagens obtidas pela técnica de AFM demonstram que as TiO₂NPs apresentam diversas geometrias e tamanhos, destacando-se nas formas cilíndrica, cúbica e piramidal (Fig. 2) o que pode impactar tanto no processo de diferenciação celular quanto em possíveis efeitos tóxicos (SOUNDARYA et al., 2018). Em adição todas as partículas apresentaram pelo menos uma das dimensões abaixo de 100nm.

As medidas de DLS demonstraram que o diâmetro hidrodinâmico da TiO₂ NPs variaram entre 500 e 1300 nm, quando dispersos de água desionizada, com índice de polidispersão (IPD) de 0,526 ± 0,05. Já o potencial Zeta foi determinado em -3,50 ± 0.40 mV. Ao se avaliar em conjunto as análises de DLS e AFM, pode se concluir que, quando dispersos em água, as TiO₂NPs formam pequenos agregados, que são identificados por um IPD superior a 0,3, onde o processo de agregação é justificado pela baixa repulsão eletrostática decorrente do módulo do potencial Zeta ser inferior a 30.

Conclusões

As nanopartículas de TiO₂ possuem elevado grau de pureza, apresentando escala nanométrica com formatos heterogêneos. Tal condição pode gerar tanto um

viés de favorecimento à diferenciação de células MSCs, quanto também um fenômeno de maior toxicidade. Dentro deste contexto, faz-se necessário, previamente ao seu uso na produção de Scaffold um profundo estudo de cito e genotoxicidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, à FAPEMIG e à CAPES. Agradecem também o apoio das Redes de pesquisa AGRONANO, mantida pela Embrapa e da Rede de Pesquisa e Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas (FAPEMIG-RED-00282-16).

Referências

- DAVE, P. N.; G OR, A. Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials: Recent Trends and Their Applications. In: **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications**. Elsevier, 2018. p. 36-66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00003-1>
- SAMIR, K. C.; LUTZ, W. The human core of the shared socioeconomic pathways: Population scenarios by age, sex and level of education for all countries to 2100. **Global Environmental Change**, v. 42, p.181-192, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2014.06.004>
- SOUNDARYA, S. P.; MENON, A. H.; CHANDRAN, S. V.; SELVAMURUGAN, N. Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.119, p.1228–1239, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.056>
- TAIRA, N.; INO, K.; ROBERT, J.; SHIKU, H. Electrochemical printing of calcium alginate/gelatin hydrogel. **Electrochimica Acta**, v. 281, p. 429-436, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.05.124>
- VOS, T. et al. (Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 386, p. 743–800, 2015. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4)