

ANDRE LUIZ REIS RANGEL

**MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA $Ti_{15}Mo$ APÓS CRESCIMENTO DE
NANOTUBOS DE TiO_2 A PARTIR DA FORMAÇÃO DE FILMES DE POLÍMEROS
BIOATIVOS**

ANDRE LUIZ REIS RANGEL

**MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA Ti15Mo APÓS CRESCIMENTO DE
NANOTUBOS DE TiO₂ A PARTIR DA FORMAÇÃO DE FILMES DE POLÍMEROS
BIOATIVOS**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia do
Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do título de Doutor em
Engenharia Mecânica na área de Materiais.

Orientadora: Ana Paula Rosifini Alves Claro

Guaratinguetá – SP
2017

FICHA CATALOGRAFICA

R196m

Rangel, André Luiz Reis

Modificação da superfície da liga Ti15Mo após crescimento de nanotubos de TiO₂ a partir da formação de filmes de polímeros bioativos / André Luiz Reis Rangel – Guaratinguetá, 2017

97 f.: il.

Bibliografia: f. 88-97

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2017.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Rosifini Alves Claro

1.Materiais biomédicos. 2. Ligas de titânio. 3.Oxidação. I. Título

CDU 620.1(043)

ANDRÉ LUIZ REIS RANGEL

ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
“DOUTOR EM ENGENHARIA MECÂNICA”

PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA: MATERIAIS

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO


Prof.ª. Dr.ª. Ana Paula Rosifini Alves Claro
Coordenadora

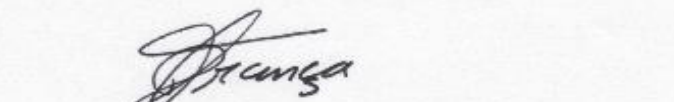
BANCA EXAMINADORA:


Prof.ª. Dr.ª. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO
Orientadora / UNESP/FEG


Prof. Dr. ROBERTO ZENHEI NAKAZATO
UNESP/FEG


Prof. Dr. RONALDO SPEZIA NUNES
UNESP/FEG


Prof.ª. Dr.ª. CECÍLIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA
UNICAMP


Prof. Dr. RODRIGO DE OLIVEIRA FRANÇA
University of Manitoba, CA

Junho / 2017

DADOS CURRICULARES

ANDRE LUIZ REIS RANGEL

NASCIMENTO	17.10.1989 – Guaratinguetá / SP
FILIAÇÃO	Andre Luiz Correard Rangel Graça de Fatima Xavier Reis Rangel
2008/2012	Curso de Graduação Engenharia de Materiais – Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá
2013/2017	Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, nível de Doutorado, na Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista.

Dedico este trabalho à Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus que concede cada oportunidade da minha vida;

à minha orientadora *Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro* pela oportunidade, apoio, motivação e dedicação durante todos esses anos, mesmo antes do início de minha tese;

aos meus pais, *Andre e Graça*, que fizeram de tudo para minha formação, educacional e ética, à minhas irmãs, *Vitoria, Rita e Ana*, pelo amor e carinho;

à minha esposa *Laura*, pelo amor, suporte e paciência;

aos amigos do Grupo de Biomateriais do Departamento de Materiais e Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Guaratingueta e do Laboratoire de biomatériaux pour la Santé da Universidade Paris 13 pelo companheirismo ;

ao Departamento de Materiais e Tecnologia - UNESP/FEG, especialmente aos técnicos e pessoal administrativo, pela dedicação e colaboração na realização das etapas deste trabalho;

ao *Prof. Dr. Roberto Zenhei Nakazato*, ao *Prof. Dr. Luís Rogério de Oliveira Hein* e ao *Prof. Dr. Ronaldo Spezia Nunes* pela ajuda e conselhos durante o desenvolvimento do trabalho;

ao *Prof. Dr. Ketul Popat* e à *prof. Dr^a. Veronique Miggoney* pelo aprendizado e colaboração nas análises *in vitro*;

ao *Prof. Rogerio Pinto Mota*, pela disponibilização do Laboratório de Plasmas, do Departamento de Física, da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá

aos meus amigos e alunos de pós-graduação *Reginaldo Toshihiro Konatu, João Carobolante, Celso Bortolini Junior, Adelvam Pereira Junior e Felipe Vicente de Paula Koidara*, pela colaboração no processamento da liga e deposições de filmes a plasma;

à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- DD 2013/00317-4) pelo suporte financeiro.

“Eu acho perturbadora a sua falta de fé.”

(Anakin Skywalker)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi obter superfícies antimicrobianas em liga de Ti15Mo após crescimento de nanotubos de TiO₂ associados a filmes poliméricos. A liga Ti15Mo foi obtida em forno de fusão a arco sob atmosfera inerte de argônio. Os lingotes foram submetidos a tratamento térmico e depois foram trabalhados a frio. Após o crescimento de nanotubos de TiO₂ por oxidação anódica, as amostras foram divididas em dois grupos para diferentes técnicas de deposição de polímeros: grafitação UV com poliestireno sulfonato (NaSS) e deposição química de vapor por plasma (PECVD) com incorporação de clorexidina. As superfícies anodizadas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, medições de ângulo de contato, difração de raios-X (DRX) e espectrometria de fotoelétrons por raios X (XPS). As superfícies cobertas com polímeros foram avaliadas quanto à molhabilidade, composição química por espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e quantidade de polímero depositado. Todas as superfícies foram submetidas a ensaios de cultura de células para avaliar sua resposta *in vitro*. A oxidação anódica foi capaz de criar uma camada homogênea de nanotubos TiO₂ para diferentes potenciais utilizados e ambos os métodos físicos e químicos foram eficientes para incorporar polímeros sobre suas superfícies. Nem os revestimentos de nanotubos ou polímeros utilizados apresentaram efeito citotóxico, por outro lado as superfícies com clorexidina foram responsáveis pela morte das células. As superfícies cobertas de PoliNaSS apresentaram melhor proliferação, morfologia e adesão celular, além disso, ensaios de diferenciação de osteoblastos confirmaram a alta atividade da fosfatase alcalina e deposição de cálcio / fosfato sobre essas amostras.

PALAVRAS-CHAVE: Biomateriais. Ligas de titânio. Oxidação anódica. Modificação de superfície. Polímeros bioativos. Osseointegração.

ABSTRACT

The purpose of this study was to obtain antibacterial surfaces on Ti15Mo alloy from TiO₂ nanotubes growth associated with polymeric films. Ti15Mo alloy was obtained in arc melting furnace under argon atmosphere. Ingots were subjected to heat treatment and then cold worked. After TiO₂ nanotubes growth by anodic oxidation samples were divided in two groups for different depositions technique: UV grafting with NaSS and plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD) with chlorhexidine incorporation. The anodized surfaces were characterized with scanning electron microscopy, contact angle measurements, x-rays diffraction and x-ray photoelectron spectroscopy. The surfaces covered with polymers were assessed for wettability, chemical composition by Fourier transform InfraRed spectroscopy and polymer deposition rate. All surfaces were subjected to cells culture essays to evaluate its *in vitro* response. The anodic oxidation was able to create a homogeneous TiO₂ nanotubes layer for different voltages and both physical and chemical methods were efficient to incorporate polymers over its surfaces. Neither nanotubes or polymers coatings presented cytotoxic effect, in the other hand surfaces with chlorhexidine were responsible for cells death. PolyNass covered surfaces showed better cells proliferation, morphology and adhesion, in addition, osteoblast differentiation essays confirmed high alkaline phosphatase activity and Calcium/Phosphate deposition over these samples.

KEYWORDS: Biomaterials. Titanium alloys. Anodic oxidation. Surface Modification. Bioactive polymers. Osseointegration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema teórico do crescimento de nanotubos de TiO ₂ e morfologia obtida para oxidação anódica do Ti-cp.....	18
Figura 2 - Nanotubos preenchidos por micelas poliméricas carregados de medicamentos e recoberto por polímeros a plasma.....	20
Figura 3 - Representação esquemática dos efeitos antimicrobianos por liberação (a) e por contato (b).....	20
Figura 4 - Classificação de materiais biomédicos por Chen e Thouas (2015).	22
Figura 5 - Diferentes aplicações de materiais biomédicos no corpo humano.	23
Figura 6 - Principais falhas em biomateriais metálicos e suas respectivas causas.	24
Figura 7 - Diagrama de fases do sistema titânio-molibdênio.	27
Figura 8 - Representação de uma célula de oxidação anódica de dois eletrodos, um cátodo metálico a ser anodizado e um anodo inerte.	30
Figura 9 - Micrografias eletrônicas de varredura para amostras de titânio puro após 48 de incubação nas condições: a) Polida, b) Anodizada.....	32
Figura 10 - Micrografias dos osteoblastos após 11 dias de crescimento. A) TiCP, B) Titânio anodizado e c) Detalhe da interação dos pseudópodes e nanotubos.....	33
Figura 11 - Deposição de cálcio sobre diferentes superfícies estudadas após intervalo de 3 semanas de cultura de osteoblastos.	33
Figura 12 - Crescimento de osso cortical de coelhos sobre superfícies de TiCP e anodizadas.	34
Figura 13 - Representação esquemática de uma câmara de tratamento à plasma.	36
Figura 14 -Redução do diâmetro de nanotubos por deposição de polímeros a plasma. A) diâmetro inicial, b) 50 segundos de deposição, c) 120 segundos de deposição, d) 200 segundos de deposição.	37
Figura 15 - Crescimento de fibroblastos (dia 3) em superfícies tratadas por filmes a plasma de POx. I) Superfície sem tratamento, II) Deposição de Poli metil oxazolína, III) poli etil oxazolína.....	38
Figura 16 - Processo de grafitação do NaSS sobre superfícies metálicas.	39
Figura 17 - Porcentagem de inibição de aderência de Staphylococcus aureus em amostras grafitados com Poli-NaSS.....	40
Figura 18 - Cultura de osteoblastos após 4 horas sobre amostras tratadas com poliNaSS em presença de diferentes proteínas. a) Soro fetal bovino, b) soro fetal bovino livre de vitronectina, c) Soro fetal bovino livre de fibronectina.....	40

Figura 19 - Cinéticas de liberação teóricas tradicionais e moduladas por superfícies tratadas.	42
Figura 20 - TNT preenchidas por micelas poliméricas carregadas de medicamentos e recoberto por polímeros à plasma.....	43
Figura 21 - Fluxograma das atividades desenvolvidas no trabalho.....	44
Figura 22 - Forno arco voltaico utilizado na fusão da liga Ti- 15Mo: (a) vista do forno; (b) interior do forno; (c) Forno de tratamento térmico.....	45
Figura 23 - Forja rotativa utilizada na conformação a frio dos tarugos.	46
Figura 24 - Amostra na célula de oxidação anódica e porta-amostra utilizado no tratamento.	47
Figura 25 - Diferentes métodos físicos e químicos de deposição de filmes bactericidas.....	48
Figura 26 - Lâmpada UV utilizada na grafitização do NaSS.	49
Figura 27 - Reator utilizado na deposição de polímeros à plasma.	50
Figura 28 - Microscópios Eletrônicos de Varredura utilizados na obtenção de imagem. a) Zeiss EVO LS15/LAIMat e b) Philips XL-30 FEG/LCE.	51
Figura 29 - Goniômetro modelo DAS 100E utilizado na avaliação de molhabilidade. Em detalhe uma gota de água deionizada sendo depositada.....	51
Figura 30 - Difratorômetro Empyrean Panalytical (EEL- USP) no qual as fases cristalinas das amostras foram analisadas.	52
Figura 31 - XPS utilizado para a avaliação da composição superficial das amostras (Laboratório de Biomaterias e Bioengenharia da Université Laval, Canadá).	53
Figura 32 - Espectrômetro utilizado para avaliar os revestimentos poliméricos realizados. ..	53
Figura 33 - Microscópio confocal utilizado para avaliação de espessuras dos filmes de PMOXA.....	54
Figura 34 - Superfície de uma amostra após incubação em azul de toluidina.....	55
Figura 35 - Câmara de fluxo laminar utilizada nos ensaios.	56
Figura 36 -Micrografias de Microscópio Eletrônico de Varredura de emissão de campo para amostras tratadas a 5 V, 10 V e 20 V. a) Vista frontal, b) Vista de um corte lateral.	62
Figura 37 - Espectros de raios-X obtidos após oxidação anódica da liga Ti15Mo para 5, 10 e 20 V por 24 horas. Todas as amostras anodizadas foram submetidas à calcinação a 450° C por 1 hora.	64
Figura 38 - Varredura XPS da liga Ti15Mo antes e após crescimento de nanotubos.	64
Figura 39 - Espectros de alta resolução para C, O e Ti da superfície da liga Ti15Mo antes e depois da oxidação anódica.	65

Figura 40 - Gráfico de barras representando o ângulo de contato de superfícies após o crescimento de filmes a plasma em diferentes potencias de deposição.	67
Figura 41 - Espectros FTIR para filmes de PMOXA depositados em diferentes potências antes e após imersão por meia hora em solução de clorexidina.	68
Figura 42 - Evolução da espessura dos filmes de PMOXA depositados de acordo com a potência de deposição.	69
Figura 43 - Valores de ângulos de contato obtidos pelo método da gota séssil de superfícies anodizadas e lamínulas de vidro revestidas por filme de PMOXA.	70
Figura 44 - Espectros FTIR dos filmes de PMOXA depositados sobre superfícies anodizadas e folhas de alumínio.	71
Figura 45 - Comparação entre ângulo de contato pelo método da gota séssil para amostras polidas (TiMo), anodizadas (TNT) e grafitizadas (TNT G).	72
Figura 46 - Espectros FTIR-ATR de amostras de Ti15Mo, Ti15Mo após crescimento de nanotubos e Ti15Mo após crescimento de nanotubos e grafitização.	73
Figura 47 - Medida da eficiência de polimerização do NaSS sobre amostras de Ti15Mo, TNT e TNT grafitizado.	74
Figura 48 - Curva de crescimento de células da linhagem MC3T3-E1 subclone 4 a densidade de semeio 50.000 células por poço.	75
Figura 49 - Absorbância medida após teste de MTT sobre as diversas superfícies avaliadas.	76
Figura 50 - Gráfico de crescimento celular de osteoblastos MC3T3-E1 SC4 em diferentes superfícies.	77
Figura 51 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura após 1 dia de crescimento de osteoblastos MC3T3-E1 sobre A) Ti15Mo, B) TNT, C) TNT G, D)PMOXA, E) PMOXA + CH.	79
Figura 52 - - Em detalhes morfologia das células após 1 dia cultura sobre A) Ti15Mo, B) TNT, C) TNTG, D) PMOXA e E) PMOXA + CH.	81
Figura 53 - - Porcentagem de células MC3T3-E1 aderidas sobre diferentes superfícies após 15 minutos de incubação.	82
Figura 54 - Porcentagem de células aderidas após aplicação de 10 dyn/cm ² por 15 minutos sobre diferentes superfícies.	83
Figura 55 - Absorbância de p-nitrofenol pela ação da enzima ALP sobre as diferentes superfícies estudadas.	84
Figura 56 - Produção de cálcio e fosfato por osteoblastos após 3 e 4 semanas de incubação sobre diferentes superfícies.	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Ligas de titânio e suas principais propriedades mecânicas.	17
Quadro 2 - Resumo de vantagens e desvantagens associadas à biomateriais metálicos.	25
Quadro 3 - Materiais da primeira (1950-1990) e segunda gerações (1990-2000) de biomateriais metálicos e suas propriedades mecânicas.	26
Quadro 4 - Resultados obtidos por Chen et al. (2006) em seus estudos de propriedades mecânicas de ligas do sistema Ti-Mo.	28
Quadro 5 - Técnicas de grafitização, suas vantagens e princípios de funcionamento.	38
Quadro 6 - Cinética de liberação de medicamentos após dip coating em polímeros biodegradáveis.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TNT	Nanotubos de titania
TNT G	Nanotubos grafitizados
PMOXA	Poli metil oxazolina
NaSS	Estireno sulfonato
PECVD	Deposição química de vapor por plasma
FTIR	Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier
DRX	Difratometria de raios X
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FE – MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura por emissão de campo
MTT	Metil tiazol tetrazolium
MEM	Meio de cultura celular “eagle”
ALP	Fosfatase alcalina
CH	Clorexidina
CCC	Cúbica de Corpo Centrado
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
POx	Poli oxazolinas
AT	Azul de toluidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
2.2	LIGAS DE TITÂNIO	25
2.3	TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIES PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS	28
2.4	MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR OXIDAÇÃO ANÓDICA	29
2.5	MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR MÉTODOS FÍSICOS	34
2.6	MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR MÉTODOS QUÍMICOS	38
2.7	UTILIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES ANTIMICROBIANAS	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	PROCESSAMENTO DA LIGA	45
3.2	TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE	46
3.2.1	<i>Oxidação anódica</i>	46
3.2.2	<i>Recobrimento com filmes antimicrobianos</i>	47
3.2.2.1	Métodos químicos: Grafitação por NaSS	48
3.2.2.2	Método Físico: Deposição de PMOXA / incorporação de CH	49
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES ANODIZADAS	50
3.3.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	50
3.3.2	<i>Ângulo de Contato</i>	51
3.3.3	<i>Análise de Difração de Raios-X (XRD)</i>	52
3.4	CARACTERIZAÇÃO APÓS RECOBRIMENTO COM FILMES POLIMÉRICOS	53
3.4.1	<i>Espessura dos filmes</i>	54
3.4.2	<i>Colorimetria por azul de toluidina</i>	54
3.5	CULTURA CELULAR	55
3.5.1	<i>Viabilidade celular</i>	57
3.5.2	<i>Morfologia celular</i>	57
3.5.3	<i>Proliferação celular</i>	57
3.5.4	<i>Adesão celular a curto período</i>	58
3.5.5	<i>Diferenciação celular</i>	58

3.5.5.1 Fosfatase Alcalina (ALP).....	59
3.5.5.2 Mineralização.....	59
4 RESULTADOS.....	61
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES ANODIZADAS	61
4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura	61
4.1.2 Ângulo de Contato e Energia de Superfície	63
4.1.3 Análise de Difração de Raios-X.....	63
4.1.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X.....	64
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE APÓS RECOBRIMENTO POLIMÉRICO	66
4.2.1 Método Físico: Polimerização a Plasma.....	66
4.2.1.1 Escolha dos parâmetros para deposição a plasma	66
4.2.1.2 Interação filme/Superfície anodizada	70
4.2.2 Método químico: grafitação por NaSS.....	71
4.3 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	75
4.3.1 Linhagem celular e curva de crescimento.....	75
4.3.2 Viabilidade celular por metil tiazol tetrazolium (MTT).....	76
4.3.3 Proliferação celular	77
4.3.4 Morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura.....	78
4.3.5 Adesão celular a curto período e Intensidade de Adesão a curto período.....	82
4.3.6 Diferenciação	83
4.3.6.1 Fosfatase Alcalina.....	84
4.3.6.2 Mineralização.....	85
5 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas concentra esforços e estudos por toda parte do mundo, sendo o principal desafio dos pesquisadores unir propriedades de volume favoráveis com superfícies que exibam boas respostas biológicas.

Dentre os biomateriais mais estudados se destacam o titânio comercialmente puro e suas ligas, em especial a liga Ti6Al4V, a qual vem sendo preterida ultimamente devido a efeitos indesejados com a sua aplicação associado aos elementos de liga vanádio e alumínio.

Dessa forma, novas ligas a base de titânio foram estudadas nas últimas décadas visando aplicações biomédicas. A liga Ti15Mo apresenta papel de destaque devido a seu baixo módulo de elasticidade (70 GPa) e elevada resistência/módulo. Além disso, apresenta elevada ductilidade e tenacidade devido a sua estrutura cristalina (CCC) justificando seu emprego na área biomédica (HO et al., 1999). O Quadro 1 expõe alguns exemplos de ligas de titânio e suas respectivas propriedades mecânicas.

Quadro 1 - Ligas de titânio e suas principais propriedades mecânicas.

Material	Módulo (GPa)	Resistência à tração (MPa)	Fase
Ti-cp	100	240-250	α
Ti6Al4V	112	895-930	$\alpha + \beta$
Ti5Al2.5Fe	110	1020	$\alpha + \beta$
Ti12Mo6Zr2Fe	74-85	1060-1100	β
Ti15Mo	70	1380	β

(fonte: adaptado de Rack, 2006)

Além do comportamento mecânico favorável, é igualmente importante para o sucesso de um implante que sua superfície seja adequada ao meio no qual será implantada. Quando um material é inserido no corpo humano uma série de reações em cascata ocorre, o que pode levar a sua integração. A primeira etapa desse processo é chamada de estabilidade primária e está relacionada à ancoragem do implante ao osso, porém com o passar do tempo essa relação perde importância em detrimento de uma segunda etapa, a ligação biológica entre as partes envolvidas (LAVENUS, 2010).

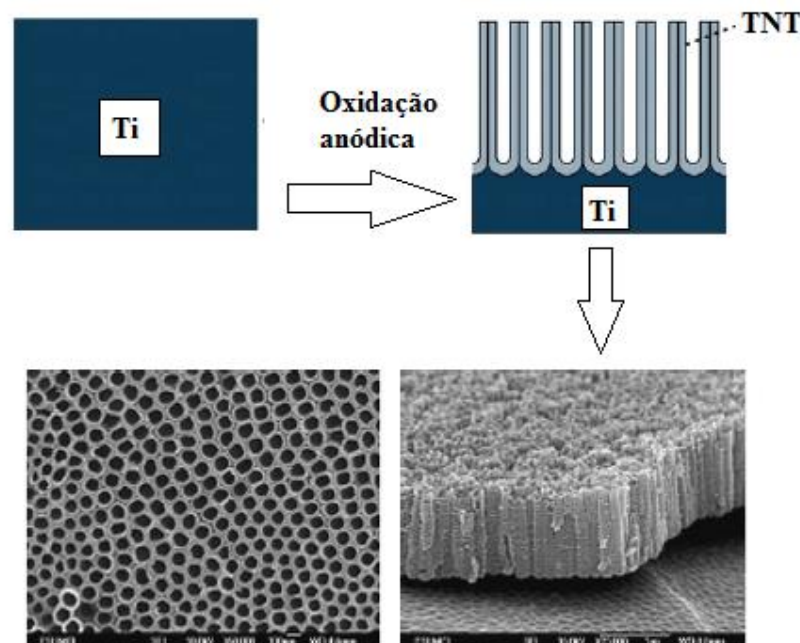
Nos últimos anos, diversos tratamentos de superfície buscando maior interação biológica foram desenvolvidos. Os tratamentos de superfície podem ser classificados em

mecânicos, físicos e químicos, de acordo com o mecanismo de modificação superficial do material (LIU et al., 2004; MIYAZAKI et al., 2002; FUKUMOTO et al., 1999; LEI et al., 2001; KIM et al., 2002; LIU; CHU; DING, 2004; RIEDEL; WILLIAMS; POPAT, 2011; ZHU et al., 2011; ALLAM; FENG; GRIMES, 2008; WANG,1996).

Dentre as diversas técnicas de modificação utilizadas pode-se ressaltar o tratamento de oxidação anódica. Neste processo dois eletrodos (um anodo de trabalho e um catodo de platina) são imersos em um eletrólito e empregando uma diferença de potencial promove-se a adsorção do oxigênio da solução no metal, formando uma camada óxida sobre o substrato (BRUNETTE et al., 2001).

Dependendo de fatores do processo (potencial aplicado, viscosidade do eletrólito, distância entre os eletrodos) e/ou propriedades do material anodizado o resultado pode variar de formação de nanoporos à nanotubos desalinhados e finalmente nanotubos alinhados.

Figura 1 – Esquema teórico do crescimento de nanotubos de TiO_2 e morfologia obtida para oxidação anódica do Ti-cp.



(fonte: Ketul, 2007)

A criação de nanoestrutura de morfologia tubular na superfície do metal, segundo Balla et al.. (2010) apresenta maior grau de oxidação e de energia de superfície, bem como melhora considerável da biocompatibilidade em comparação com superfícies lisas. Estudos também apontam que superfícies nanoestruturadas se assemelham à estrutura da matriz extracelular (CHANG, 2012) e essa morfologia favorece a adesão celular de maneira direta e

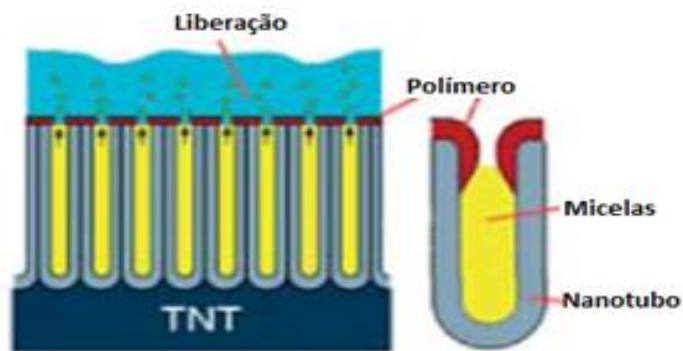
indireta (CHOE, 2011; POPAT, 2007 a,2007 b; SMITH, 2010, 2011). É importante ressaltar que a morfologia dos nanotubos, seja comprimento, diâmetro e/ou espessura da parede tem papel fundamental na estabilização da fase constituinte do dióxido de titânio (BAUER, 2011) o que por sua vez pode também influenciar o crescimento celular.

É de vital importância para a caracterização de um biomaterial a sua resposta biológica e se propõem duas vias para essa avaliação: estudos *in vitro* (por cultura de célula em laboratório) e *in vivo* (com implantação do material em um hospedeiro animal). Tal sequência é proposta já que os primeiros ensaios obtêm respostas confiáveis sem a necessidade de sacrifício de animais (BRAMMER, 2008). Assim sendo ensaios de cultura de células sobre discos de biomateriais metálicos são amplamente utilizados para essa finalidade.

Durante tais ensaios células de linhagem adequadas são cultivadas sobre biomaterial e deverão se fixar e proliferar sobre a superfície. No entanto, Smith et al.. (2010, 2011) constataram que essa proliferação é muito mais eficaz em superfícies recobertas por nanotubos, com maior atividade mitocondrial de células, como verificado por testes de viabilidade celular (OH et al.. 2006). Os mesmos autores atribuem esse comportamento ao estímulo no alongamento celular exercido por superfícies nano-organizadas e ainda, segundo Altankov (1996), materiais ultra-hidrofílicos (característica comum em superfícies anodizadas) são mais favoráveis à adesão e proliferação celular.

Mais recentemente, pesquisadores tem buscado utilizar superfícies com nanotubos para liberação de medicamentos *in situ*. Entretanto, a liberação por superfícies com nanotubos simplesmente preenchidos por medicamentos é de difícil controle o que torna essencial o emprego de um tratamento que auxilie esse processo (SONG, 2009). Dentre as alternativas propostas, pode-se destacar o recobrimento de nanotubos com camadas poliméricas. Aw et al. (2011) obtiveram sucesso em seus estudos a partir do preenchimento de TNTs com micelas poliméricas anfifílicas contendo medicamentos no seu interior e posterior recobrimento por uma camada de polímero (alilamina) à plasma (Figura 2). A combinação dessas técnicas possibilitou a liberação controlada do medicamento reduzindo a velocidade em mais de 200%.

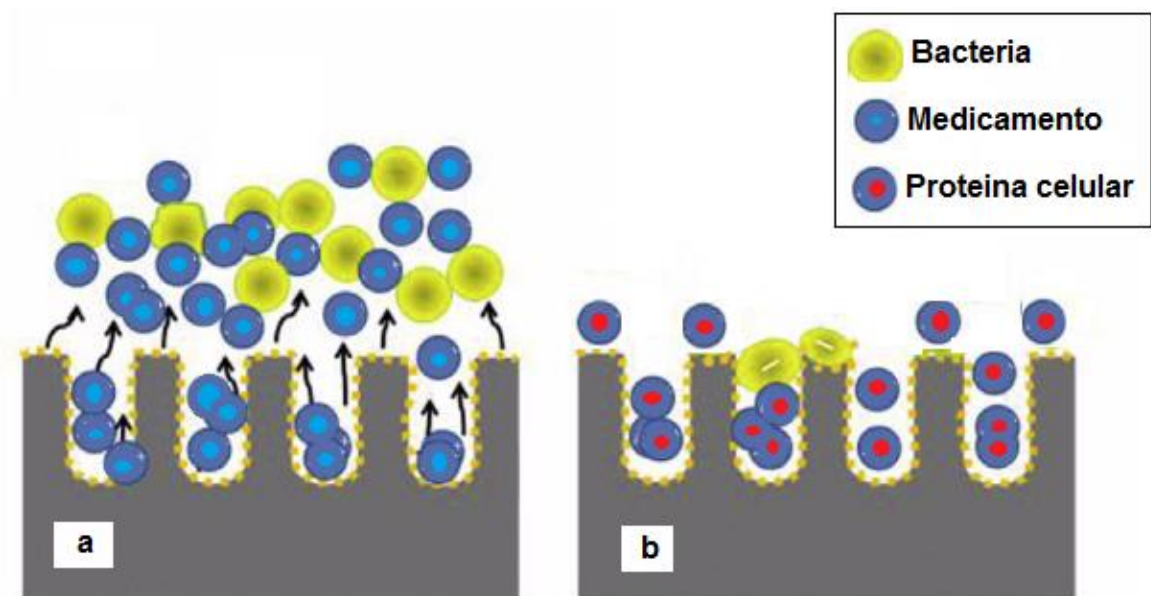
Figura 2 - Nanotubos preenchidos por micelas poliméricas carregados de medicamentos e recoberto por polímeros a plasma.



(fonte: adaptado de Aw, 2011)

Outra possibilidade promissora que vem sendo explorada no combate a infecções sobre implantes é o recobrimento de superfícies por polímeros bioativos (CHOUIRFA, 2016). Ao contrário do que acontece em superfícies carregadas de medicamentos o objetivo desta técnica não é destruir possíveis bactérias aderidas e sim impedir a adesão inicial ao facilitar a ligação com proteínas celulares. A Figura 3 ilustra a diferença no mecanismo de ação das duas técnicas.

Figura 3 - Representação esquemática dos efeitos antimicrobianos por liberação (a) e por contato (b).



(fonte: adaptado de Jia, 2016)

Dessa forma a associação de materiais metálicos com propriedades de volume reconhecidamente viáveis, superfícies nanoestruturadas e recobrimentos poliméricos representa uma promissora opção na pesquisa de materiais para aplicações biomédicas.

1.1 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal a modificação da superfície da liga Ti15Mo a partir do crescimento de nanotubos de TiO_2 e sua associação com superfícies antimicrobianas, para promover melhor resposta biológica contra crescimento bacteriano sem prejudicar o crescimento celular nas superfícies de implantes biomédicos.

Para tanto foi necessário o desenvolvimento das seguintes metas:

- Determinar os parâmetros ideais para oxidação anódica da liga;
- Caracterização da camada de óxido de TiO_2 por Microscopia Eletrônica de Varredura, ângulo de contato e análise de difração de raios-X;
- Avaliar a citotoxicidade, adesão e proliferação celular sobre a liga anodizada;
- Realizar recobrimentos antimicrobianos por métodos químicos e físicos;
- Avaliar a citotoxicidade, adesão, proliferação e diferenciação celular após recobrimentos poliméricos.

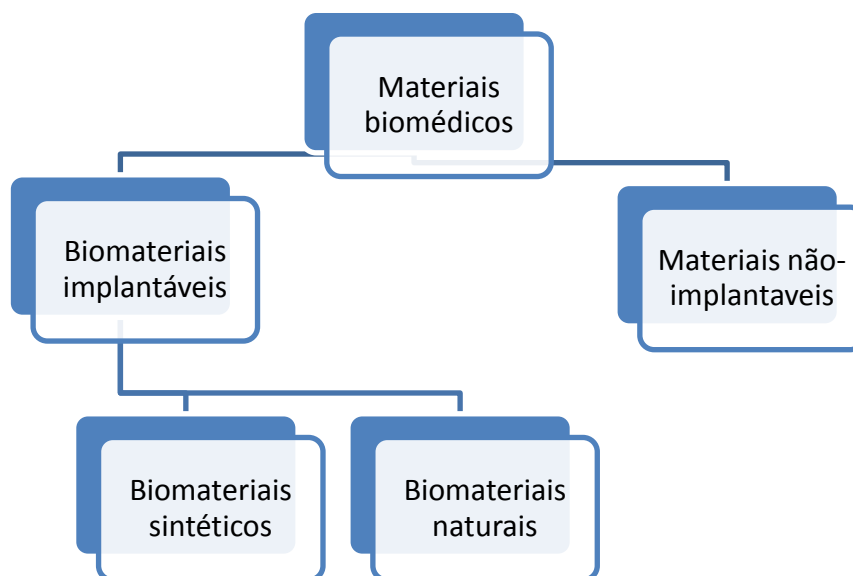
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações Gerais

O termo biomateriais foi definido inicialmente na década de 1980 como “material usado na fabricação de sistemas médicos, destinados a interação com sistemas biológicos” (WILLIAMS, 1987), porém atualmente a definição mais amplamente aceita é a utilizada pelo *National Institute of Health* (Instituto Nacional de Saúde norte-americano) que aceita como biomaterial “Qualquer substância ou combinação de substâncias, com exceção das drogas, de origem sintética ou natural, que pode ser usado por qualquer período de tempo, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo ” (WILLIAMS, 1999). Tal definição muito mais ampla e abrangente reflete tanto a evolução no campo científico dos biomateriais quanto as diversas mudanças ocorridas ao longo dos anos na sociedade em geral, reafirmando a importância crescente desses materiais para a saúde e bem-estar da população.

Em uma definição ainda mais abrangente, porém em concordância com a anterior, Chen e Thouas (2015) classificam biomateriais como uma divisão de materiais biomédicos de acordo com a possibilidade ou não de implante. Para esses autores biomateriais poderiam ainda se dividir em biomateriais sintéticos e biológicos, como representado na Figura 4.

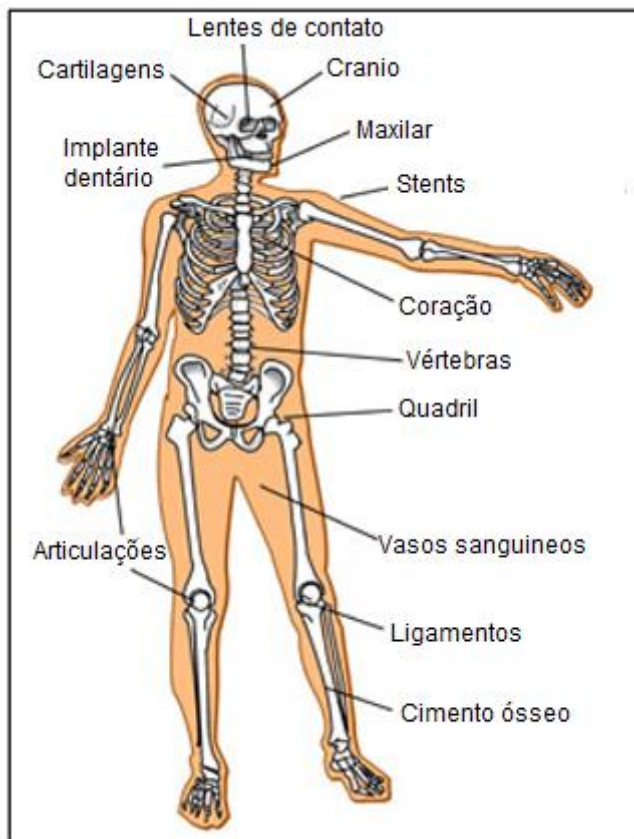
Figura 4 - Classificação de materiais biomédicos por Chen e Thouas (2015).



(fonte: Chen e Thouas, 2015)

Nos dias de hoje os biomateriais sintéticos podem ser aplicados nas mais variadas funções, em todo o corpo do ser humano (Figura 5). Naturalmente, isso exige uma vasta gama de propriedades físicas, químicas e biológicas que faz com que todas as classes de materiais estudadas nas ciências de materiais (metais, polímeros, cerâmicas e compósitos) tenham aplicabilidade neste campo.

Figura 5 - Diferentes aplicações de materiais biomédicos no corpo humano.



(fonte: Adaptado de MIT OpenCourseWare)

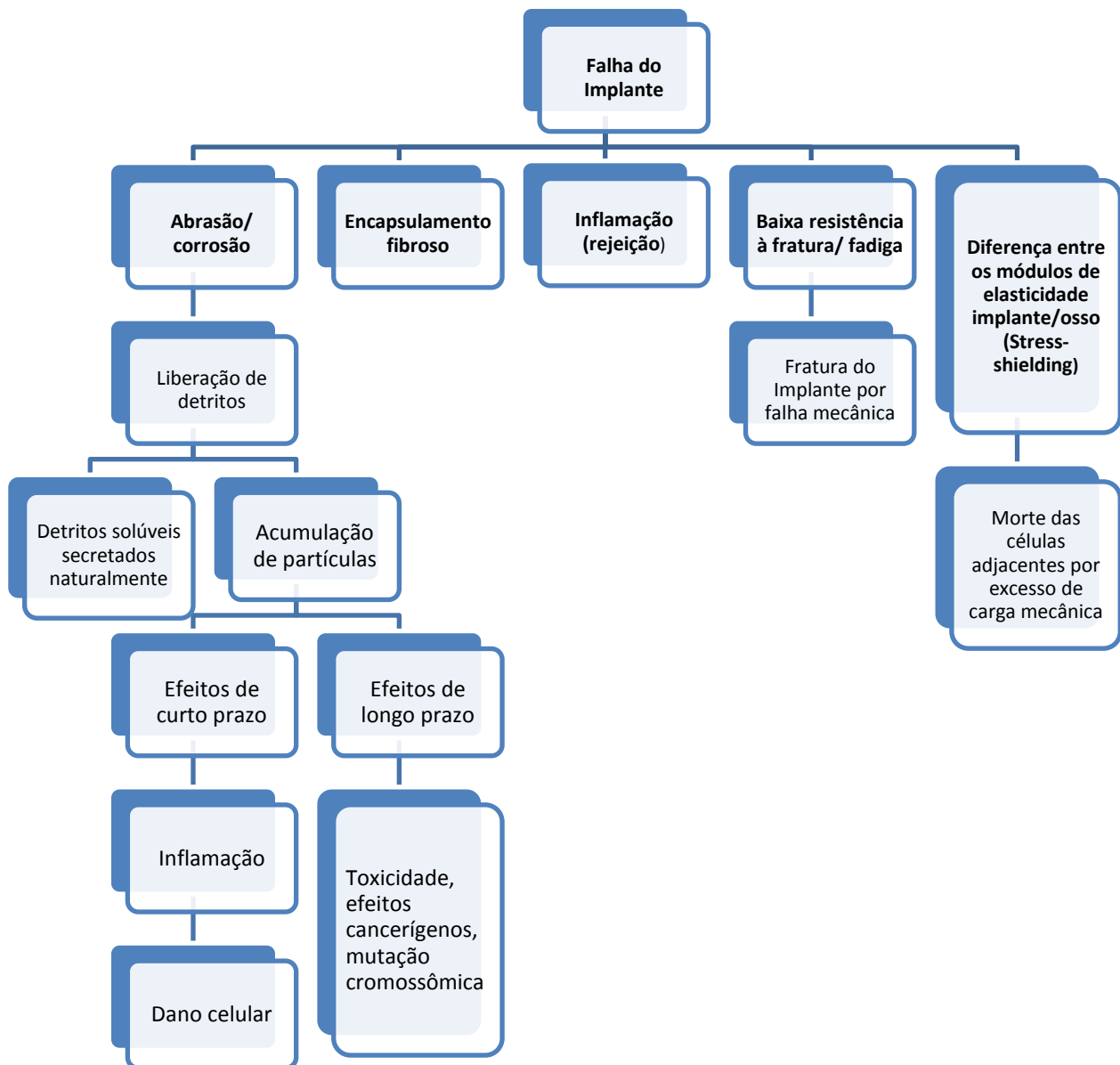
Dentre as inúmeras possibilidades de aplicação de biomateriais metálicos se destaca a substituição de tecidos duros, como por exemplo implantes dentários, parafusos, placas de fixação proximal/distal e próteses de quadril.

A primeira prótese de quadril metal-metal foi confeccionada em aço inoxidável e data da década de 1950 (LONG, 1998). Embora essas próteses correspondessem parcialmente às expectativas, a popularização do procedimento cirúrgico de colocação de implantes levou ao estudo mais cuidadoso da seleção de materiais elegíveis para sua confecção.

Os critérios adotados para a seleção dos biomateriais são dependentes de fatores como: meio em que serão empregados, idade do paciente, custo e aplicação, sendo a escolha baseada principalmente em suas propriedades mecânicas, resistência a corrosão e biocompatibilidade (GEETHA et al., 2009).

Os principais fatores relacionados com a falha do implante podem ser visualizados na Figura 6.

Figura 6 - Principais falhas em biomateriais metálicos e suas respectivas causas. Nota-se que as falhas podem ocorrer por características de volume, de superfície ou combinação de ambos.



(fonte: Adaptado de Geetha, 2009).

Diante de tantas imposições, as possibilidades de materiais viáveis para esta aplicação são bastante reduzidas e atualmente se concentram basicamente em três tipos: aço inoxidável, ligas de cobalto-cromo e ligas de titânio (RACK, 2006).

O Quadro 2 sintetiza as vantagens e desvantagens de cada uma dessas opções.

Quadro 2 - Resumo de vantagens e desvantagens associadas à biomateriais metálicos.

	Aço inoxidável austenítico	Ligas Co-Cr	Ligas de Ti
Elementos de ligas	Cr, Ni, Mo	Mo, Ni	Al, V, Nb, Mo, Ta
Vantagens	Custo, disponibilidade, processabilidade	Resistencia à abrasão, corrosão e fadiga	Biocompatibilidade, resistência à corrosão e fadiga, módulo de elasticidade baixo (55 – 110 GPa)
Desvantagens	Alto módulo de elasticidade (200 GPa), comportamento à longo prazo	Alto módulo de elasticidade (200 – 230 GPa)	Baixa resistência à abrasão, custo

(fonte: adaptado de Long, 1998)

Comparando os requisitos e as propriedades apresentadas fica evidente a superioridade do titânio e suas ligas e justifica a concentração de tantos pesquisadores da área de biomateriais no desenvolvimento e modificação de ligas titânio para a confecção de próteses. A possibilidade de aliar propriedades como resistência a corrosão do titânio e comportamento mecânico modulável por adição de elementos de liga, representaram um ganho real e um avanço significativo na busca por melhores implantes.

2.2 Ligas de Titânio

No início da década de 1950 o pesquisador sueco Per-Ingvar Brånemark realizou uma descoberta que mudaria a história dos biomateriais. Durante a realização de experimentos sobre a circulação sanguínea Brånemark implantou em coelhos uma camera fotográfica

envolta em uma cápsula de titânio com intenção de remove-la após o termino do experimento. Para a sua surpresa, ao fim do período a capsula mostrou-se intimamente ligada ao osso, fato que chamou atenção do pesquisador e o levou a mudar seu foco de pesquisa para fabricação de implantes (BRANEMARK, 1983), culminando na primeira cirurgia de implante dentário de titânio em 1965.

O material utilizado na confecção dos primeiros implantes é conhecido hoje como titânio comercialmente puro, ou Ti-cp, com pureza na ordem de 99,5% obtido a partir do rutilo.

O Ti-cp é um material alotrópico apresentando mudança de fase de hexagonal compacta (conhecida como fase α) à fase cubica de fase centrada (fase β) acima de 882°C (BAUER, 2007). Embora o sucesso inicial em seu uso, o Ti-cp teve como limitante de sua atuação a baixa resistência à fadiga e alto módulo de elasticidade, valores que se mostraram mais vantajosos em suas ligas. Segundo Kurtz et al. (2007) intervenções para revisão de implantes de quadril devem ter um aumento de 137% até 2030.

Neste contexto, a liga α - β Ti-6Al-4V se destacou como alternativa viável e foi amplamente utilizada durante anos (NIINOMI, 1998). No entanto, nas últimas décadas os elementos alumínio e vanádio têm sido contestados e apontados como formadores de compostos nocivos ao paciente implantado (EISENBARTH, 2004). Ao mesmo tempo, ligas livres de vanádio e contendo somente elementos estabilizadores de fase β foram apontadas como tendo maior resistência a fadiga e abrasão, mantendo ou mesmo reduzindo o módulo de elasticidade (YOSHINARI, 2001). O Quadro 3 relaciona alguma das ligas comumente utilizadas e respectivas propriedades mecânicas (RACK, 2006).

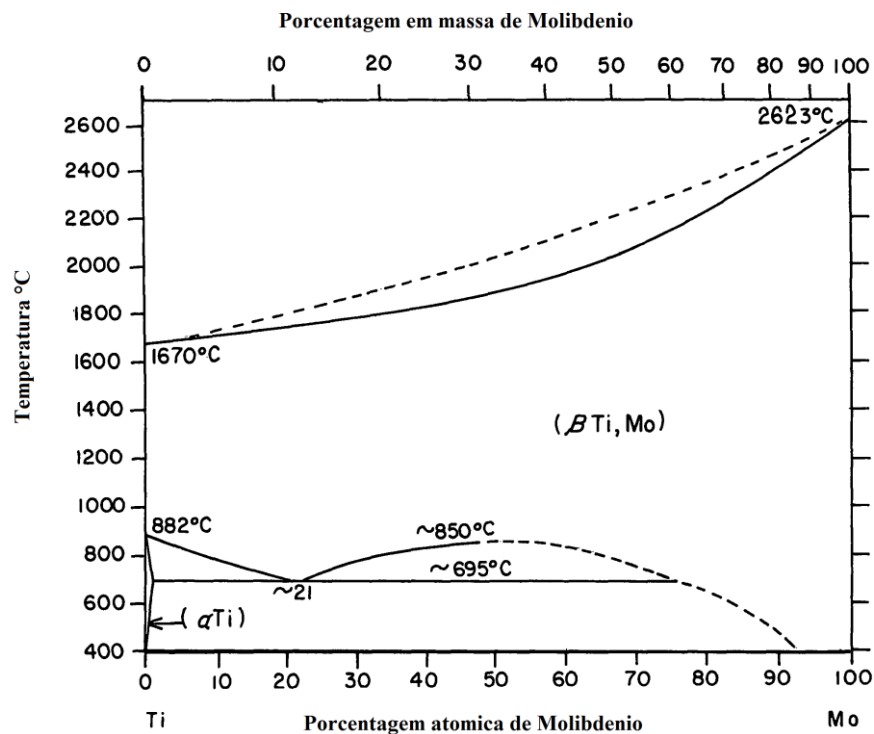
Quadro 3 - Materiais da primeira (1950-1990) e segunda gerações (1990-2000) de biomateriais metálicos e suas propriedades mecânicas.

Material	Módulo (GPa)	Resistência à tração (MPa)	Fase
Ti-cp	100	240-250	α
Ti-6Al-4V	112	895-930	$\alpha + \beta$
Ti-5Al-2.5Fe	110	1020	$\alpha + \beta$
Ti-12Mo-6Zr-2Fe	74-85	1060-1100	β
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	55	596	β
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-0.4 O	66	1100	β

(fonte: adaptado de Rack, 2006)

O sistema titânio-molibdênio, se mostrou uma atrativa opção visto a baixa toxicidade do elemento de liga e boas propriedades mecânicas e vem sendo estudado ao longo da última década a fim de determinar composições favoráveis à aplicação biomédicas (CHAVES, 2016; ESCADA, 2013, 2017; HO, 2009; YU-YONG,2006). O diagrama de fase do sistema Ti-Mo é representado na Figura 7.

Figura 7 - Diagrama de fases do sistema titânio-molibdênio.



Ho et al. (1999) estudaram ligas com porcentagem de molibdênio entre 6 e 20% em massa e comprovaram que a estrutura cristalina da liga é sensível à composição. Ligas com 6 a 7,5% de Mo em massa apresentam estrutura hexagonal ortorrômbica na fase α' enquanto para amostras entre 10 a 20% de elemento de liga, a estrutura é cubica de corpo centrada, característica da fase β e de maior aplicabilidade no campo de biomateriais devido a propriedades mecânicas superiores em comparação ao seu alotropo.

Tal constatação pode ser reafirmada com base em Chen et al. (2006) que ao estudar o comportamento mecânico de ligas na mesma faixa de porcentagem de massa comprovou que ligas com 15 e 20% de molibdênio tem valores de módulo de elasticidade e dureza Vickers menores que ligas com 5 ou 10% de Mo. Os resultados são expostos no Quadro 4.

Quadro 4 - Resultados obtidos por Chen et al. (2006) em seus estudos de propriedades mecânicas de ligas do sistema Ti-Mo.

Teor de molibdênio (%m)	Dureza Vickers (HV)	Resistência a compressão (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)
5	441	1876	30,4
10	451	1636	29,8
15	381	1560	26,7
20	392	1546	27,0

(fonte: adaptado de Chen 2006)

2.3 Tratamentos de superfícies para aplicações biomédicas

Apesar de essenciais no sucesso de um material para aplicação biomédica, propriedades de volume não são as únicas variáveis a serem analisadas quando se trata do desenvolvimento de biomateriais. Pelo contrário, a interação entre o meio biológico e o implante acontece na superfície e a reação decorrente dessa interação será determinante para o sucesso do material implantado.

De modo geral essa relação pode acontecer de duas formas: formação de membrana fibrosa entre a superfície e o implante, ou o desenvolvimento de uma interação direta osso/implante com adesão das células ósseas sobre o metal, ao qual se dá o nome de osseointegração (GUÉHENNEC, 2007). A ocorrência do primeiro evento impede o segundo, sendo portanto primordial que a ancoragem dos osteoblastos aconteça o mais rápido possível uma vez em contato com o biomaterial (OH, 2006).

Em outras palavras, o implante só poderá ser considerado bem-sucedido se for osseointegrado e o desenvolvimento desse processo é dependente de características tais como molhabilidade, rugosidade e composição da superfície. Todas estas características estão interligadas na medida que a composição da superfície e rugosidade são primordiais para interação com líquidos, afetando a molhabilidade, a qual por sua vez mudará a maneira com que células ósseas se proliferam pela superfície. Por outro lado, a diferenciação das células é profundamente ligada a composição da superfície (FELGUEIRAS, 2015) e seu crescimento se dará principalmente em lacunas deixadas pela rugosidade (POPAT, 2007).

Diante disso, e considerando as já consagradas propriedades de volume das ligas de titânio, a modificação de superfície surge como novo desafio na busca de dispositivos ainda mais eficientes e duradouros.

De acordo com Sobieszczyk (2010) os métodos de modificação de superfícies podem ser divididos em 3 categorias:

- Mecânicos: Métodos baseados em alteração da topografia da superfície por meio mecânico, seja com aumento ou diminuição da rugosidade. De maneira geral não afetam a composição da superfície. Como exemplos de métodos mecânicos pode-se citar o lixamento, polimento e jateamento;
- Químicos: Métodos que promovem alteração da superfície por ação de algum reagente ou processo químico. Tais processos podem alterar a rugosidade da superfície, como no caso de ataques ácidos e básicos ou alterar sua composição como por exemplo deposição química de vapor, recobrimento por *dip coating*, *spin coatings* entre outros.
- Físicos: Alterações baseadas em processos físicos. Assim como acontece nos métodos químicos as alterações podem focar em rugosidade, *plasma spray* é a principal técnica dessa vertente, ou a composição da superfície, o que acontece por exemplo na implantação iônica.

Ainda deve ser levado em conta que estes processos podem ser combinados, visando complementar seus resultados e que, devido a relação descrita anteriormente, todas as técnicas terão influência na molhabilidade das amostras.

2.4 Modificação de Superfície por Oxidação Anódica

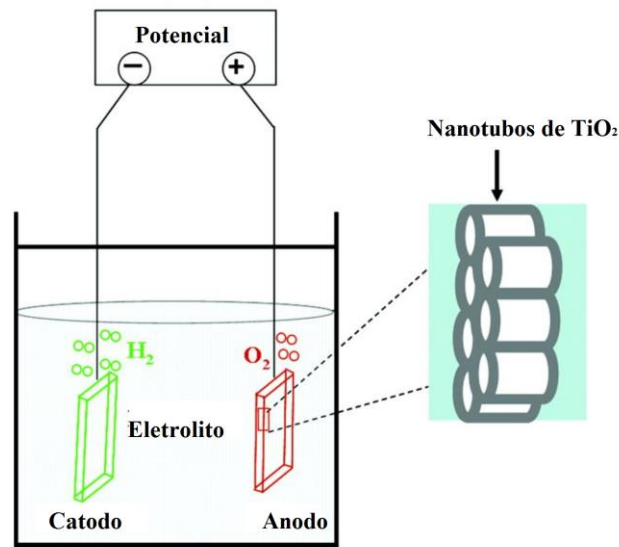
A nanoestruturação do óxido naturalmente presente na superfície de ligas de titânio vem sendo estudada há anos em ciência dos materiais devido ao alto potencial de utilização em áreas que variam de fotocatalise à confecção superfícies anti - bacterianas (CHAVES, 2015).

A primeira menção de produção de nanotubos na literatura data de 1984 por Assefpour-Dezfuly et al. (1984), os quais submeteram superfícies de titânio à oxidação anódica a fim de avaliar a morfologia e adesão do óxido.

Apesar de efetivo, o método passou um longo tempo sem ser estudado e outros processos de crescimento de TNT foram desenvolvidos por outros grupos pelo mundo, como processos de sol-gel ou tratamento hidrotérmal, ainda que sem alcançar o nível de organização ou facilidade de realização da oxidação anódica. O panorama mudou por volta dos anos 2000 quando o advento do uso de nanotecnologia na área de biomateriais deu novo fôlego a técnica (KULKARNI, 2015; VARGHESE, 2002).

O processo eletroquímico em questão consiste na imersão de dois eletrodos, um ânodo constituído do metal à ser anodizado e um cátodo de material inerte em um eletrólito. Sobre os eletrodos se aplica então um campo elétrico, na forma de tensão ou corrente elétrica. A Figura 8 mostra o arranjo experimental de uma célula de oxidação anódica.

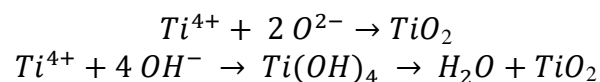
Figura 8 - Representação de uma célula de oxidação anódica de dois eletrodos, um cátodo metálico a ser anodizado e um anodo inerte.



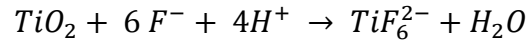
(fonte: Adaptado de Neupane, 2011.)

A ação do campo elétrico realiza o transporte de íons entre os dois eletrodos, promovendo reações de oxidação na superfície do metal, porém, o desenvolvimento de estruturas nanotubulares se baseia na relação entre a formação e a dissolução de óxido, a qual só acontece em condições específicas relacionadas sobretudo à composição do eletrólito.

Segundo Taveira et al. (2005) a reação de formação de óxido no cátodo se dá pela oxidação do titânio metálico à Ti^{4+} , o qual pode se combinar diretamente à íons O^{2-} ou hidroxilas. Nesse segundo caso, o íon passara por uma forma intermediária antes de sua decomposição em dióxido de titânio. As equações envolvidas são representadas a seguir:



Por outro lado, a reação de dissolução é dependente da composição do eletrólito, em especial da presença de íons fluoreto. Tal dependência é explicada pela capacidade do íon de atacar o dióxido de titânio e formar o complexo TiF_6^{2-} , de acordo com a seguinte reação:



O complexo TiF_6^{2-} é solúvel em água e voltará para o seio da solução uma vez formado.

Diante disso, é possível inferir que em presença de eletrólitos fluoretados as reações de formação e dissolução de óxido serão concomitantes e concorrentes possibilitando a formação de uma arquitetura única e nanoestruturada na superfície tratada.

Os eletrólitos mais comumente usados no tratamento de oxidação anódica são soluções de HF ou sais de fluoreto em água, glicerol ou etileno-glicol. O teor de soluto e a natureza do solvente influenciarão também a morfologia dos tubos formados, uma vez que eletrólitos mais viscosos ou com menos íons oferecerão maior resistência no transporte de cargas entre um eletrodo e outro (KULKARNI, 2015). Esse fator pode ser balanceado pela regulagem de distância entre os eletrodos.

Outros fatores reportados como atuantes na morfologia final do óxido são:

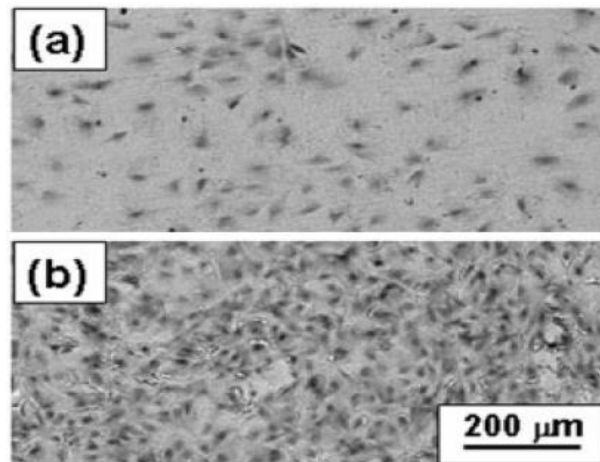
- Tempo: Como é esperado, aumento no tempo de tratamento foi reportado como responsável por maior crescimento de óxido, resultando em nanotubos mais longos (VASILEV, 2010);
- Potencial: Uma das características mais interessantes para aplicação biomédica de superfícies anodizadas é a relação diretamente proporcional entre aumento de voltagem de tratamento e aumento do diâmetro dos nanotubos (KHUDHAIR, 2016; RANGEL, 2016). Esse controle de dimensões abre portas para uma vasta gama de aplicações.

No que diz respeito às características físico-químicas os TNT produzidos por oxidação anódica são amorfos ao fim do tratamento, porém podem ser cristalizados por tratamento térmico de calcinação. Assim como o dióxido de titânio denso, os TNT cristalizados possuem formas alotrópicas, destacadamente anatase e rutilo. As faixas de temperatura de estabilização das fases cristalinas citadas são alvo de controvérsia entre pesquisadores que estudaram o comportamento térmico dos óxidos (YU, 2010; CHAVES, 2016; REGONINI, 2010), ainda que todos estabeleçam que temperaturas mais baixas que 500 °C serão predominantemente formadoras de anatase. Além da temperatura, Bauer et al. (2011) afirmam que o diâmetro dos nanotubos também é um fator decisivo na fase cristalina final dos TNT.

O crescimento e propagação de osteoblastos após anodização de titânio comercialmente puro foram estudados por Jin et al. (2006) e os resultados obtidos foram promissores no que concerne ao aumento do número de células aderidas mesmo em curto

intervalo de tempo. A Figura 9 mostra micrografias de varredura eletrônica do crescimento celular após 48 horas de incubação. O aumento chega a mais de 300% entre as condições analisadas e é atribuído principalmente à topografia da superfície, pois além de prover um aumento substancial da área superficial, apresenta também um caminho para o crescimento dos pseudópodes celulares.

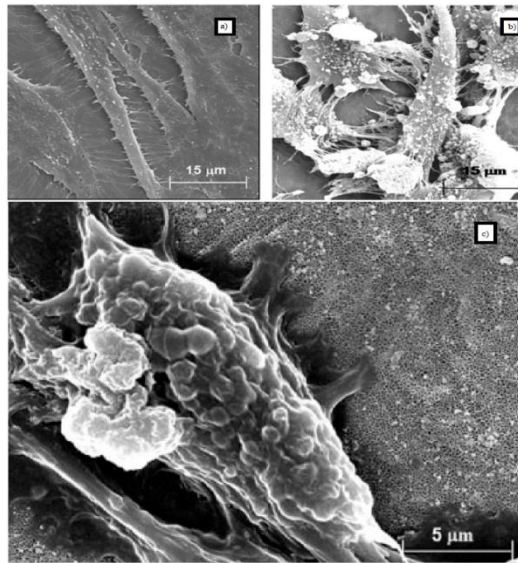
Figura 9 - Micrografias eletrônicas de varredura para amostras de titânio puro após 48 de incubação nas condições: a) Polida, b) Anodizada.



(fonte: adaptado de JIN, 2006)

Esta maior osteocunditividade devido a ancoragem dos pseudópodes foi confirmada por Das et al. (2009) na medida que as células não só são verificadas em maior quantidade sobre superfícies anodizadas, mas também possuem morfologia mais desenvolvida e espalhadas. A Figura 10 mostra células após 11 dias de crescimento.

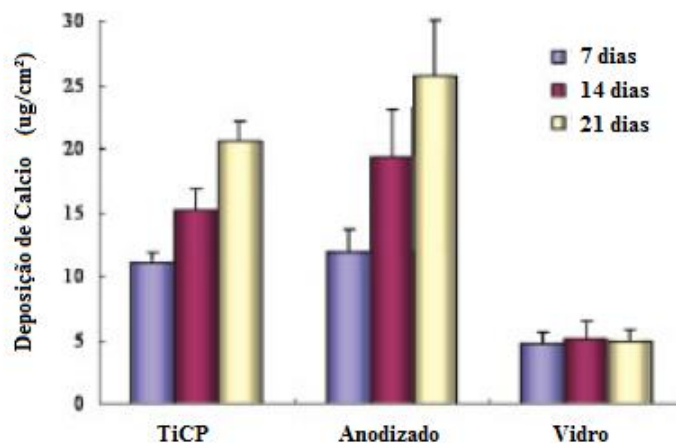
Figura 10 - Micrografias dos osteoblastos após 11 dias de crescimento. A) TiCP, B) Titânio anodizado e c) Detalhe da interação dos filopodes e nanotubos.



(fonte: adaptado de Das, 2006)

Igualmente, estudos *in vitro* comparando a diferenciação de osteoblastos sobre superfícies anodizadas em relação a titânio não tratado e superfícies vítreas mostraram que a deposição de cálcio sobre as superfícies é influenciada pela morfologia (YAO, 2007), como pode ser visto na Figura 11. Tal resposta é notável, pois essa mudança na composição química da superfície, sobretudo em relação a um componente básico do osso humano levando a inferir que a anodização traz efeitos benéficos também em longo prazo.

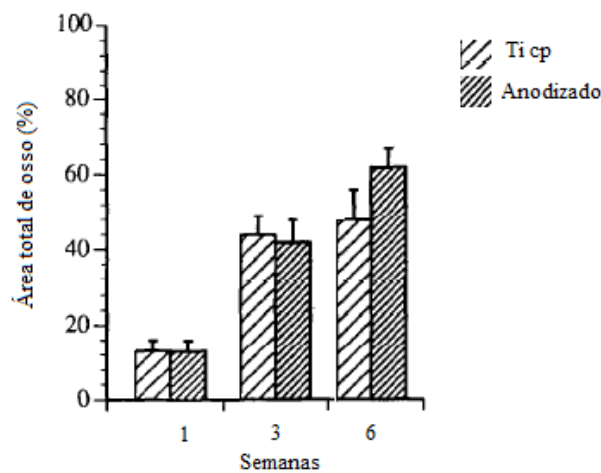
Figura 11 - Deposição de cálcio sobre diferentes superfícies estudadas após intervalo de 3 semanas de cultura de osteoblastos.



(fonte: adaptado de Yao, 2007)

Tais resultados justificariam a maior taxa de formação óssea obtidas *in vivo* para implantes anodizados como, por exemplo, nos estudos realizados por Ericson et al. (1996), no qual implantes de TiCP de diferentes condições foram implantados na tíbia de coelhos e avaliados ao longo de 6 semanas com intuito de estudar a diferença na formação óssea sobre superfícies de diferentes rugosidades. A Figura 12 mostra a diferença na porcentagem da superfície recoberta por matéria óssea ao longo do experimento.

Figura 12 - Crescimento de osso cortical de coelhos sobre superfícies de TiCP e anodizadas ao longo de seis semanas. Os resultados indicam que a longo prazo o osso recobriu mais as superfícies anodizadas em comparação com superfícies lisas.



(fonte: adaptado de Ericson, 1996).

2.5 Modificação de superfície por métodos físicos

Ainda que a topografia de superfícies tratadas por oxidação anódica seja favorável à osseointegração, quimicamente os nanotubos continuam sendo constituídos pelo mesmo dióxido de titânio altamente estável e inerte encontrado em camadas compactas e assim tratamentos adicionais podem complementar seu efeito benéfico sobre as células (LAI, 2011). Um exemplo fortuito é a funcionalização de superfícies revestidas por polímeros, a qual pode ser realizada por métodos químicos, como o spin coating, dip coating, grafitação, ou físicos, dentre os quais se destaca a modificação por plasma.

O plasma é comumente definido como o quarto estado da matéria, uma massa de gás ionizado composto por íons, moléculas ou átomos altamente excitados (CHU, 2002). O plasma pode ser encontrado naturalmente, mas quase sua totalidade em regiões desabitadas do universo, devido à série de condições necessária para sua estabilização.

Em laboratório o plasma pode ser criado por excitação de gases empregando radiofrequência, micro-ondas, descargas elétricas entre outras técnicas à baixa pressão ou

pressão atmosférica e sua utilização vem crescendo em popularidade por ser considerada uma técnica limpa, com alto grau de reprodutibilidade e controle de parâmetros.

Além disso as variadas técnicas de modificação existentes que se utilizam dessa tecnologia são adaptáveis para tratamento de peças de diferentes geometrias e podem alterar a morfologia, energia e composição química da superfície de inúmeros materiais. Todas essas características fazem com que esses métodos sejam uma excelente alternativa para modificação de biomateriais.

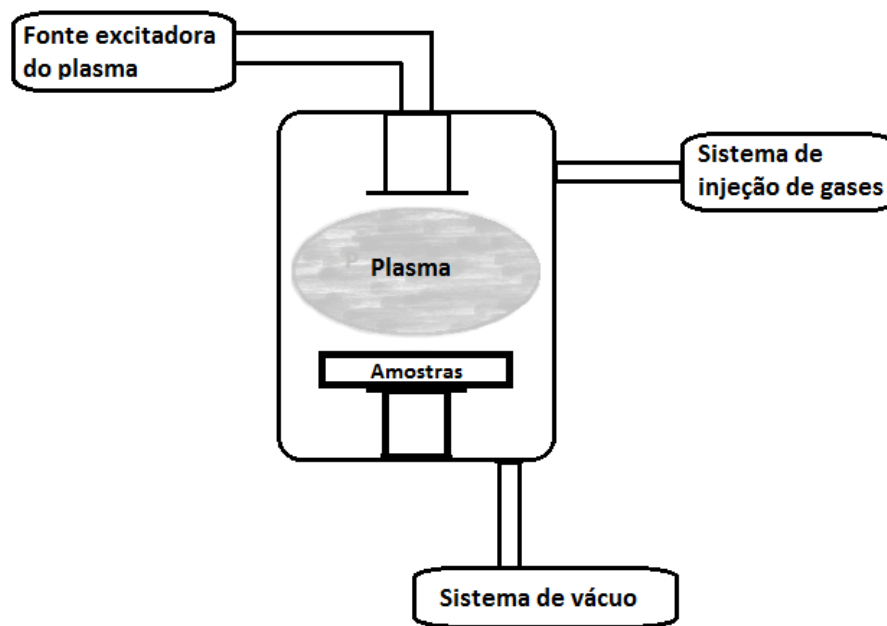
As principais técnicas utilizadas nesse campo da ciência de materiais são (CHU, 2002):

- Plasma *Sputtering/Etching*: Técnicas de alteração de morfologia por retirada de material da superfície. O princípio de funcionamento de ambas as técnicas consiste em aplicar uma tensão elétrica nas amostras enquanto imersas em um plasma de gases inertes (especialmente argônio). A diferença de potencial criada atrai para a superfície elementos do plasma com carga inversa à carregada nas amostras. A interação entre os elementos atraídos e superfície pode ser inteiramente física, com colisões, transferência de energia e arrancamento de partículas, o que é conhecido como *sputtering* e mais frequentemente relatado em tratamento de materiais metálicos, ou química, na qual o choque causará reações de degradação da superfície e consequente perda de material. Esse evento é conhecido como *etching* e ocorre principalmente em tratamento de polímeros,
- Implantação Iônica por Imersão à Plasma (IIIP): O princípio de funcionamento desta técnica é bem similar ao utilizado para o *etching* ou *sputtering*, porém a tensão aplicada nas amostras é consideravelmente maior e o plasma é criado a partir de gases reativos e com átomos menores que o argônio, notadamente oxigênio, nitrogênio, flúor entre outros. A principal mudança promovida por esse tratamento acontece na composição final da superfície, visto que os elementos atraídos são fortemente incorporados.
- Polimerização à Plasma: Técnica de recobrimento da superfície tratada por uma camada de material polimérico criada pelo plasma de monômeros, em geral hidrocarbonetos ou outros compostos orgânicos. As partículas excitadas sofrem choques, quebram e recombinaem-se no plasma durante todo o processo antes de tocarem a superfície das amostras e formarem uma estrutura com alta porcentagem de ligações cruzadas. A espessura do filme depositado pode ser modulada pelos

parâmetros de tratamento, sendo assim esta técnica é capaz de modificar tanto a composição quanto a morfologia da superfície.

Os tratamentos supracitados ocorrem no interior de câmaras como representadas na Figura 13.

Figura 13 - Representação esquemática de uma câmara de tratamento à plasma.



(fonte: próprio autor)

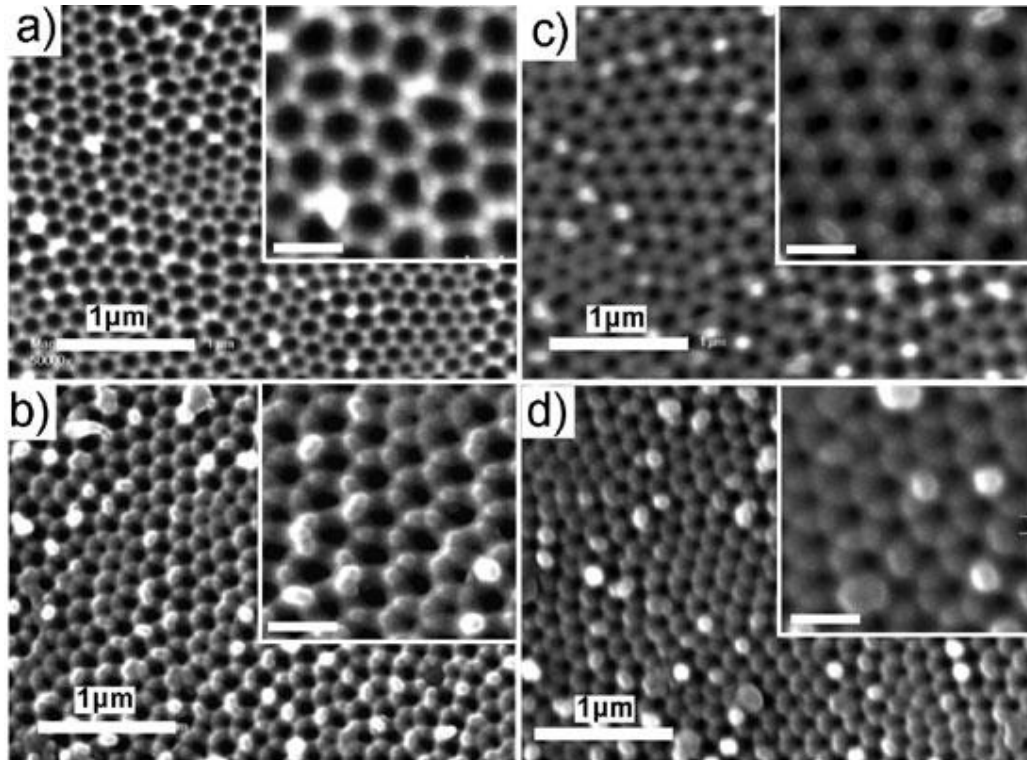
São considerados como parâmetros de influência no tratamento essencialmente as variáveis capazes de alterar a força ou frequência de colisões entre as partículas do plasma. As dimensões da câmara e a distância entre as amostras e os eletrodos alteram o caminho médio entre cada colisão, enquanto que a tensão aplicada aumenta a aceleração das partículas e consequentemente a força de colisão e finalmente a pressão no interior da câmara representa a quantidade de partículas por cm^3 o que altera o número de colisões.

O revestimento de titânio por polímeros à plasma tem sido reportado por diversos autores nos últimos anos em superfícies anodizadas ou não (CHEN, 2007; GULATTI 2012; VAZILEV, 2011).

Estes estudos afirmam que, além de bem-sucedido como método de deposição de uma camada aderente (MU-RONG, 2000) e de espessura controlável (HAYKAWA, 2003) o uso da polimerização a plasma pode ser aliado ao crescimento de nanotubos para a criação de um sistema de liberação controlada de medicamentos, visto que devido ao nível de controle sobre

a deposição o método permite a redução da abertura do nanotubos sem alterar seu volume (SIMOVIK, 2010) como visto na Figura 14.

Figura 14 -Redução do diâmetro de nanotubos por deposição de polímeros a plasma. A) diâmetro inicial, b) 50 segundos de deposição, c) 120 segundos de deposição, d) 200 segundos de deposição.

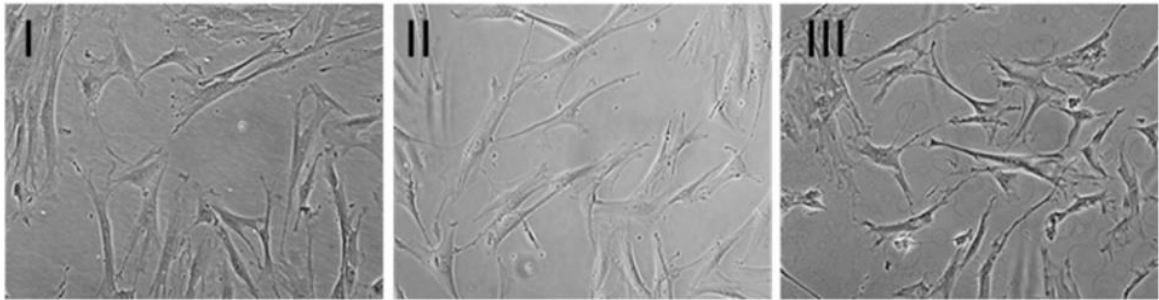


(fonte: Simovic, 2010)

Os polímeros da classe Polioxazolinás (POx) foram inicialmente estudados em polimerização tradicional para aplicações biomédicas devido a características como baixa polidispersão, facilidade de funcionalização e biocompatibilidade e se tornaram uma alternativa para diferentes aplicações biomédicas (DE LA ROSA, 2013). Por outro lado, o processo tradicional de grafitação do polímero é complicado e envolve polimerização em solução e posterior fixação sobre as superfícies a serem tratadas (MACGREGOR-RAMIASA, 2015), o que motivou pesquisadores a utilizarem a polimerização a plasma como procedimento alternativo.

O método é relativamente novo, porém estudos mostram-se promissores quanto a não citotoxicidade em superfícies recobertas (CAVALLARO, 2016) como pode ser observado na Figura 15.

Figura 15 - Crescimento de fibroblastos (dia 3) em superfícies tratadas por filmes a plasma de POx. I) Superfície sem tratamento, II) Deposição de Poli metil oxazolína, III) poli etil oxazolína.



(fonte: adaptado de Cavallaro, 2016).

2.6 Modificação de superfície por métodos químicos

Ainda que a fabricação de polímeros por métodos químicos seja uma área de pesquisa extremamente explorada novas demandas por estes materiais surgem diariamente, sobretudo na área biomédica onde vem se estabelecendo como alternativa importante para aplicações clínicas (SUBHASH, 2014) sobretudo quando grafitizado sobre superfícies de outros biomateriais.

O termo grafitização (do inglês *grafting*), também conhecido como enxertia, se refere à implantação de um polímero na superfície de outro material e diversas técnicas podem ser utilizadas nesta manipulação, como por exemplo iniciação química, radiação eletromagnética e radiação UV (PILLAY, 2013). O Quadro 5 expõe as principais técnicas de grafitização, bem como os princípios de funcionamento e vantagens.

Quadro 5 - Técnicas de grafitização, suas vantagens e princípios de funcionamento.

Técnica		Princípio	Propriedades
Iniciação química		Geração de radicais por reação química	Alteração superficial de polímeros
Iniciação por radiação	Fotolítica	Geração de radicais por radiação UV	Não há necessidade de iniciadores químicos
	Gama	Geração de radicais por radiação gama	
Iniciação enzimática		Geração de radicais por ação de enzimas	Alta especificidade do produto final

(fonte: adaptado de Pillay, 2013)

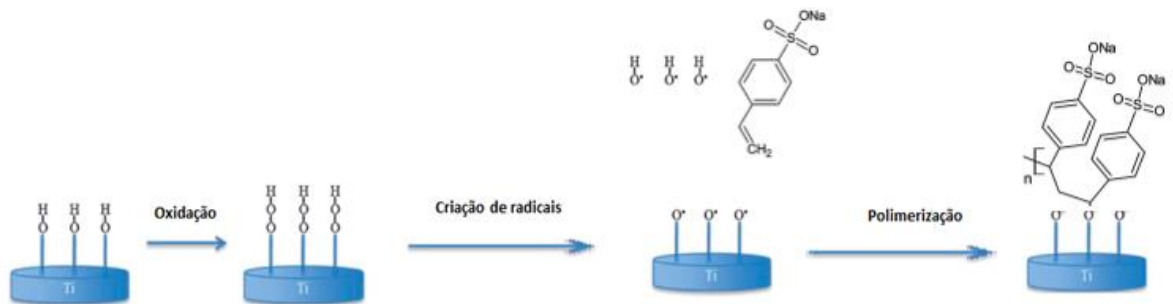
Esta técnica ganhou destaque nos últimos anos devido a possibilidade de implantação de moléculas bioativas em superfícies de implantes (ZORN, 2011) com o intuito de melhorar à adesão celular por imobilização de proteínas extracelulares, destacamente a grafitação de poliestireno sulfonato (MIGONNEY, 2013).

A grafitação de poliestireno sulfonato de sódio (Poli-NaSS) foi estudada por Oughlis et al. em 2011, com objetivo de criar superfícies ricas em grupos iônicos negativos, os quais atuam como sítios ativos para interação com proteínas como fibrinectinas e fatores de crescimento ósseo. Para tanto, basearam-se no método preconizado por Michiardi et al. em 2009, o qual foi posteriormente adaptado também por Chouirfa et al. em 2016. Tal método consiste em duas etapas:

- Pré-tratamento da superfície por imersão em solução ácida. O objetivo dessa etapa é a criação de peróxido de titânio, o qual é decomposto e forma radicais capazes de iniciar a polimerização;
- Polimerização por imersão das amostras pré-tratadas em solução de NaSS. Esta etapa pode ser realizada por ação de temperatura ou radiação ultra violeta.

A Figura 16 representa a grafitação de NaSS sobre superfícies de titânio.

Figura 16 - Processo de grafitação do NaSS sobre superfícies metálicas.



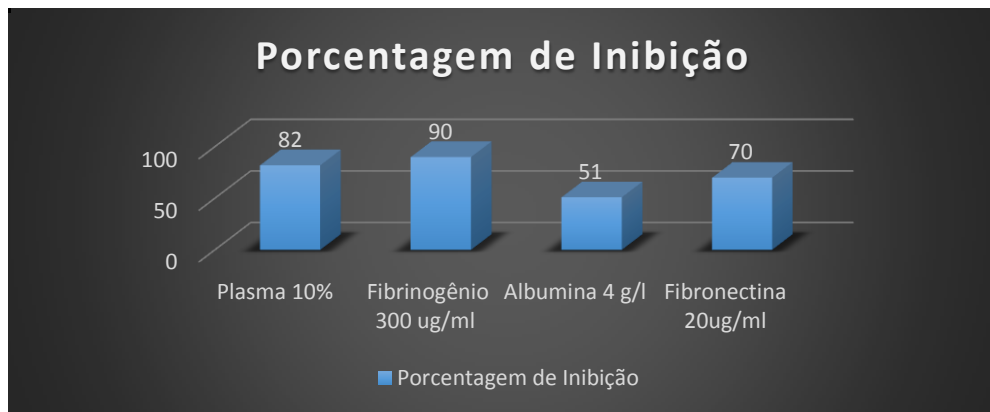
(fonte: adaptado de Chouirfa, 2016)

A absorção de proteína obtida por Oughlis et al. (2011) foi avaliada por cromatografia e uma substancial diferença foi observada. Entre amostras tratadas, por volta de 24% do total possível de proteínas foram absorvidas enquanto que em amostra não tratadas o valor foi abaixo do mensurável.

Além disso, proteínas absorvidas por superfícies com grupos sulfonatos tem ação inibidora de aderência e posterior desenvolvimento de bactérias, como apontado por diversos pesquisadores (ALCHEIKH, 2013; VASCONCELOS, 2014). Ben Aissa et al. (2011)

também estudaram a aderência de *Staphylococcus aureus* sobre superfícies com poliNaSS na presença de plasma sanguíneo e diferentes soluções proteicas obtendo resultados promissores no que diz respeito a inibição da aderência bacteriana. Na Figura 17 se pode observar o nível de inibição nos diferentes meios avaliados. Os resultados indicam que a interação do material é diferente entre as diversas proteínas estudadas, o que produz taxas de adesão diferente, destacadamente a interação Poli-NaSS e fibrinogênio reduz em 90% a presença da bactéria:

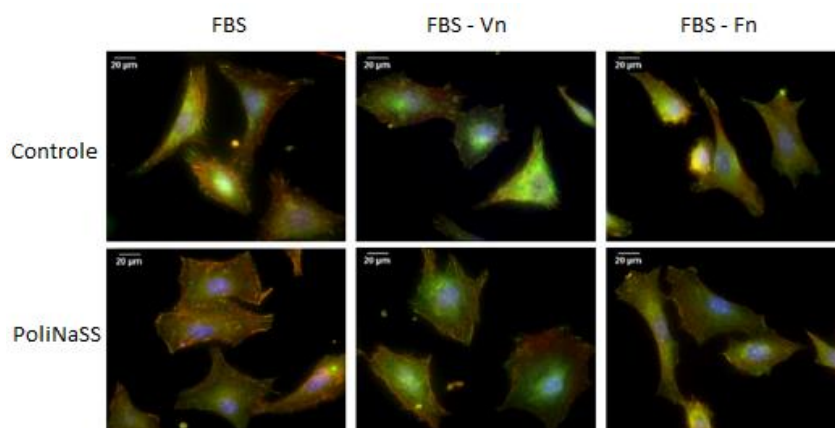
Figura 17 - Porcentagem de inibição de aderência de *Staphylococcus aureus* em amostras grafitizados com Poli-NaSS.



(fonte: adaptado de Ben Aissa, 2011)

Finalmente a interação entre o polímero e proteínas do meio biológico resulta em rápida adesão celular como verificado por Felgueiras et al. (2015). Osteoblastos cultivados em presença de diferentes tipos de soros proteinados exibiram melhor espalhamento sobre superfícies recobertas por poliNaSS quando comparada a superfícies de titânio polido, como visto na Figura 18.

Figura 18 - Cultura de osteoblastos após 4 horas sobre amostras tratadas com poliNaSS em presença de diferentes proteínas. a) Soro fetal bovino, b) soro fetal bovino livre de vitronectina, c) Soro fetal bovino livre de fibronectina.



(fonte: adaptado de Felgueiras, 2015)

O efeito benéfico dos grupamentos sulfonados do poliNaSS sobre os osteoblastos estendem-se ainda para a fase de mineralização *in vitro* onde marcadores de diferenciação celular como atividade de fosfatase alcalina e deposição de cálcio e fosfato foram reportados como superiores por diversos autores (ALCHEIK, 2013; HELARY, 2009; MAYINGI, 2008), e *in vivo* com maior formação óssea (KENER, 2010; FELGUEIRAS, 2017). A combinação de efeitos bactericidas e aptidão à osseointegração em um único tratamento é raro e faz da grafitização por poliNass um procedimento digno de atenção.

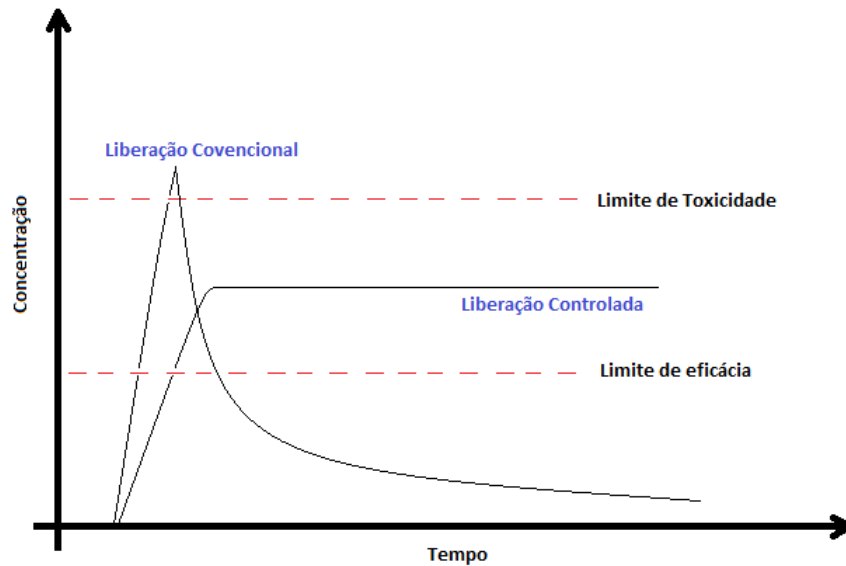
2.7 Utilização de superfícies antimicrobianas

Estima-se que até 0,5% dos implantes de quadril falhem por infecção, valor que sobe para 4% em cirurgias na região do joelho (STIGER, 2004). Barbour et al. (2008) estudou a adesão bacteriana (*Streptococcus gordonii*) em presença de rutilo e anatase, encontrando maior cobertura bacteriana em superfícies do segundo alotropo, soma-se a isso a maior acumulação de bactérias em superfícies rugosas (WU, 2011) e torna-se claro que ainda muito se pode fazer para aprimorar superfícies anodizadas.

O uso da clorexidina é considerado o padrão entre os tratamentos antisépticos sobre implantes por ser a substância mais largamente testada e utilizada e de comprovada eficácia bactericida (GIANELLI, 2008). Em 2015 Bueno et al. compararam a ação de 5 diferentes agentes antimicrobianos tendo como resultado a inibição de 90% de bactérias *Candida albicans* em todos os casos, porém a dose de clorexidina necessária para manter o efeito inibitório por 14 dias é inferior a de outros medicamentos. Por outro lado, diversos trabalhos (CHANG, 2001; GIANELLI, 2008, SEGURA, 1999) reportaram efeitos negativos da clorexidina sobre crescimento celular *in vitro*, infelizmente pouco se sabe sobre a cinética de liberação do medicamento nesses casos contudo sabendo que os medicamentos usuais são atuantes somente se a concentração se encontrar em uma faixa limitada, tal resultado pode ser mais eficiente se a cinética de liberação acontecer de forma gradativa e não com crescimento exponencial durante um breve período de tempo seguido por rápida queda como observa-se em tratamentos convencionais nos quais durante todo período em que a concentração está fora da faixa de atuação ela é improdutiva ou mesmo prejudicial, pois concentrações acima do recomendado podem apresentar danos ao organismo (LANGER, 1981).

Nesse contexto, em busca de uma ação rápida e eficiente a proposta de uma superfície capaz de controlar a liberação de medicamento foi alvo de estudos nos últimos anos (GULATI, 2012; SONG, 2009; YOSHINARI, 2001;). O objetivo é criar um método cuja cinética de liberação fosse semelhante ao representado na Figura 19.

Figura 19 - Cinéticas de liberação teóricas tradicionais e moduladas por superfícies tratadas.

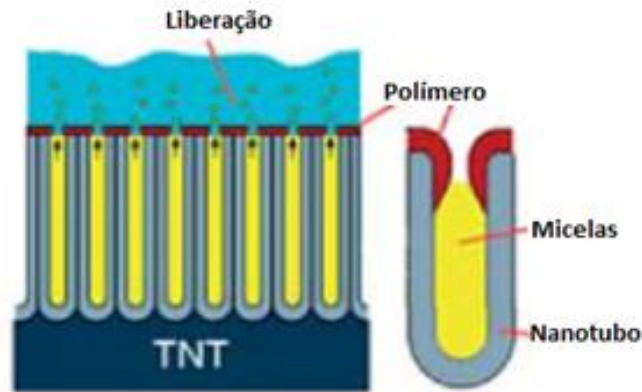


(fonte: próprio autor)

Como se pode notar, o perfil apresentaria menores riscos à saúde, pois não atingiria o limite de toxicidade e agiria por mais tempo. Além disso a atuação local, representa um considerável avanço na eficiência do processo.

Recentemente, pesquisadores tem buscado utilizar a arquitetura tubular dos nanotubos como reservas de medicamentos à serem liberados *in situ*, entretanto, a liberação por superfícies com nanotubos simplesmente preenchidos por medicamentos é de difícil controle o que torna essencial a realização de um tratamento subsequente (SONG, 2009). Como as alternativas propostas, podemos destacar mais uma vez o recobrimento de nanotubos por camadas poliméricas à exemplo de Aw et al. (2011) os quais mostraram em seus estudos que micelas poliméricas anfifílicas poderiam ser preenchidas com medicamentos, fixadas em nanotubos e posteriormente recobertas a plasma por uma camada de aproximadamente 70 nm de polímero. A comparação da liberação entre amostras recobertas ou não por plasma mostrou que amostras não tratadas liberavam menos de 50% de medicamento em 8 horas e o restante entre 8 e 22 dias, o que pode ser considerado uma evolução em relação ao carregamento simples, porém a aplicação de plasma pode reduzir a velocidade de liberação em mais de 200%. Esse comportamento pode ser atribuído ao estreitamento do nanotubos pelo polímero, como representado na Figura 20.

Figura 20 - TNT preenchidas por micelas poliméricas carregadas de medicamentos e recoberto por polímeros à plasma.



(fonte: adaptado de Aw, 2011)

Ainda neste tópico, Gulati et al. (2011) carregaram nanotubos de titânio com anti-inflamatórios e revestiram as amostras por *dip coating* em quitosana e PLGA, ambos polímeros biodegradáveis. Embora o procedimento realizado fosse mais simples, os resultados foram igualmente interessantes e mostraram que a liberação pode ser estendida em relação a amostras não recobertas e ainda alterada em função da espessura da camada polimérica, como resumido no Quadro 6.

Quadro 6 - Cinética de liberação de medicamentos após *dip coating* em polímeros biodegradáveis.

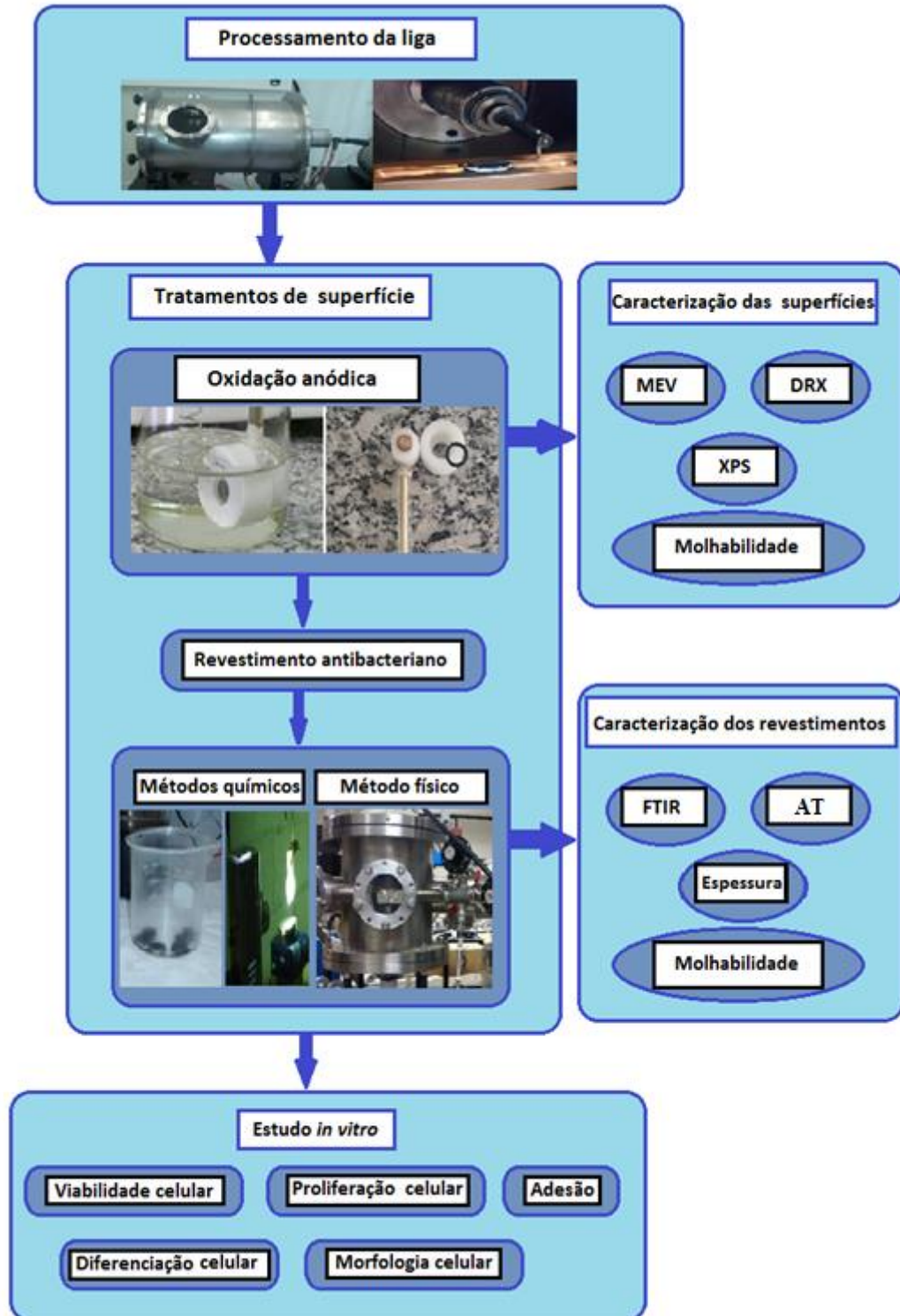
	Espessura (μm)	Liberação (%)			Tempo de liberação total (dias)
		6 hrs	1 dia	7 dias	
Não tratada	-	77	90	100	4
Quitosana	0,2-03	40	51	98	9
Quitosana	2-2,5	35	67	88	30
PLGA	0,3-04	57	61	72	19
PLGA	1,5-2	12	14	16	31

(fonte: adaptado de Gulati, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 21 descreve as principais etapas desenvolvidas na execução do trabalho:

Figura 21 - Fluxograma das atividades desenvolvidas no trabalho.



(fonte: próprio autor)

3.1 Processamento da liga

Os lingotes da liga Ti15Mo foram obtidos a partir de chapas de titânio e molibdênio comercialmente puros. Inicialmente os materiais foram cortados com auxílio de uma guilhotina em pequenas placas e decapados quimicamente por imersão em uma solução formada por ácido fluorídrico (HF) e ácido nítrico (HNO₃) na proporção 1:3 por 10 segundos, seguidos por lavagem em água corrente. Após esse procedimento os metais foram pesados em balança analítica de acordo com a composição da liga, de forma a totalizar 20 g, e colocados no interior do forno para fusão em um cadinho de cobre refrigerado a água, como pode ser visto na Figura 22b.

Para garantir que durante a fusão não ocorreria oxidação foi realizada a purga com argônio. O forno foi fechado e utilizando uma bomba de vácuo o ar atmosférico em seu interior foi retirado para então ser substituído por argônio. Esse processo foi repetido pelo menos cinco vezes, garantindo dessa forma a formação de atmosfera inerte no interior do forno.

A fusão do material nesse tipo de equipamento ocorre devido ao calor gerado pelo arco elétrico criado entre o material a ser fundido e o eletrodo de tungstênio do forno. Para garantir a homogeneidade da amostra o material sofreu 10 fusões sendo que após o término de cada uma a amostra fundida foi girada em 90°.

Após a fusão, os lingotes de 20g foram agrupados em 3, refundidos e unidos utilizando o mesmo processo descrito anteriormente, sendo obtido dessa forma um lingote de 60g de liga Ti15Mo.

Figura 22 - Forno arco voltaico utilizado na fusão da liga Ti- 15Mo: (a) vista do forno; (b) interior do forno; (c) Forno de tratamento térmico.



(fonte: próprio autor)

Os lingotes foram submetidos a tratamento térmico de homogeneização em forno tubular de atmosfera inerte de argônio a 900°C por 24 horas com resfriamento lento e separadas para conformação. A forja utilizada para o forjamento rotativo a frio pode ser vista na Figura 23 e empregando martelos de diferentes circunferencias permitiu a obtenção de cilindros com 10 mm de diâmetro.

Após forjamento, a liga foi submetida à solubilização aquecida a 900°C por 1 hora e resfriada rapidamente em água.

Figura 23 - Forja rotativa utilizada na conformação a frio dos tarugos.



(fonte: próprio autor)

As barras foram cortadas usando cortadeira de precisão (ISOMET 4000) para obter discos de 3 mm de espessura. Os discos foram lixados em lixas d'água de granulometria crescente (200, 400, 600, 1000, 1200 e 1500, 2000) e polidos em politriz rotativa utilizando sílica coloidal 10µm (OPU Struers).

3.2 Tratamentos de superfície

Os tratamentos de superfície empregados neste trabalho dividem-se em duas etapas: oxidação anódica e deposição de polímeros antimicrobianos.

3.2.1 Oxidação anódica

Os nanotubos de TiO₂ foram obtidos na superfície da liga empregando oxidação anódica. Para preparar o eletrólito, 2,5g de fluoreto de amônia foram dissolvidos em 100 mL de água destilada e essa solução foi adicionada a 900 mL de glicerol. A solução foi homogeneizada or

agitação mecânica durante 5 minutos. Os discos de liga foram posicionados no porta-amostra visto na Figura 24 e arranjados nas células de oxidação anódica na posição de eletrodo de trabalho.

Para cada amostra foram utilizados 100 mL de eletrólito, sendo então o conjunto conectado a uma fonte de tensão. A tensão foi elevada de 1 V/min até que se atingisse a tensão desejada e somente após esse ponto se iniciou a contagem do tempo de oxidação anódica. No decorrer do trabalho e baseado em trabalhos precedentes realizados pelo grupo de pesquisa (CAPELLATO 2012; ESCADA 2013) as condições de potencial estudadas foram de 5, 10 e 20 V, todas mantidas por 24 horas de tratamento.

Figura 24 - Amostra na célula de oxidação anódica e porta-amostra utilizado no tratamento.



(fonte: próprio autor)

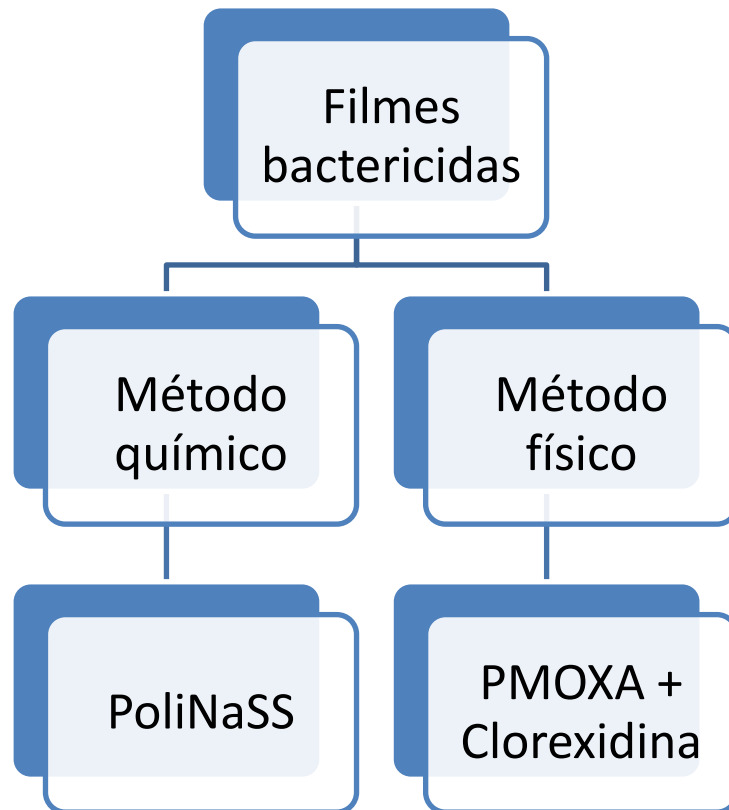
Após a oxidação anódica, as amostras foram retiradas do porta-amostras, lavadas em água corrente, depositadas em um béquer com água destilada e mantidas em banho ultrassônico por 5 minutos para limpeza.

Com objetivo de cristalizar a camada amorfa de TiO_2 nanoestruturada, as amostras foram submetidas à calcinação por 450°C durante 1 hora. As peças foram armazenadas em dessecadora e armazenadas em vácuo até a etapa subsequente do trabalho.

3.2.2 Recobrimento com filmes antimicrobianos

Após a anodização dois filmes poliméricos foram depositados na superfícies das amostras empregando métodos químicos e físicos, conforme o esquema da Figura 25.

Figura 25 - Diferentes métodos físicos e químicos de deposição de filmes bactericidas.



(fonte: próprio autor)

3.2.2.1 Métodos químicos: Grafitação por NaSS

A grafitação por NaSS foi realizada em estágio na Universidade Paris XIII, sob supervisão da Prof. Dra. Véronique Migonney (FAPESP 2015/26273-9) de acordo com o protocolo estabelecido por Falentin-Daudré et al.. (Patente FR 15 57621, 2015). As amostras foram inseridas em um balão contendo solução de NaSS (0,7 mol / L) e submetido a degaseificação por inserção de argônio por 30 minutos. Posteriormente o balão é submetido à radiação UV (365 nm) por 1 hora à 170 mW/cm². A Figura 26 ilustra o processo de irradiação por UV. Em seguida, as amostras foram lavadas com água deionizada, secas e armazenadas sob vácuo. As amostras tratadas por grafitação não foram submetidas à incorporação de medicamentos, visto que o polímero em si apresenta características antibacterianas.

Figura 26 - Lâmpada UV utilizada na grafitação do NaSS.



(fonte: próprio autor)

3.2.2.2 Método Físico: Deposição de PMOXA / incorporação de CH

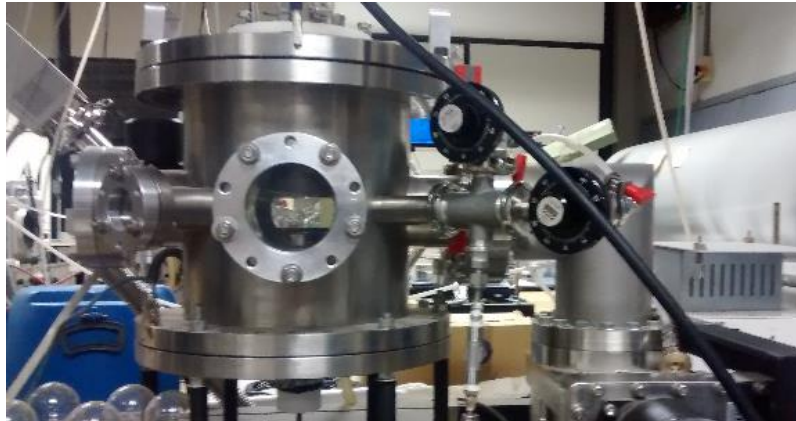
Para realização da deposição foi utilizado um sistema de reator em aço inoxidável no formato cilíndrico medindo 180 mm de diâmetro por 300 mm de altura, com volume aproximado de 7,5 litros como visto na Figura 27. O plasma foi estabelecido no interior do reator entre dois eletrodos circulares, planos e paralelos. O monômero selecionado para depósitos foi o 2-metil-2-oxazoline (MOXA) e a pressão de trabalho no reator foi de 60 Pa, em proporção 1:1 de MOXA e argônio. O controle da pressão no interior do reator de plasma foi realizado por meio de um sensor operando na faixa de pressão de 10^5 a 10^{-2} Pa e a leitura do valor de pressão fica a cargo de uma unidade digital controladora de pressão. As deposições foram realizadas no Laboratório de Física de Plasma, da Faculdade de Engenharia de Guaratingueta.

Os plasmas foram excitados por radiofrequência de 13,56 Hz, com potência variando entre 5 e 20W. O tempo de exposição foi fixado em 1 hora.

A deposição foi inicialmente realizada sobre diferentes substratos afim de possibilitar a caracterização do filme e escolha da melhor condição de deposição. As medidas de ângulo de contato e a estimativa de espessura foram realizadas sobre lamínulas de vidro para microscopia enquanto os espectros de FTIR foram obtidos a partir de filmes depositados sobre folhas de alumínio.

A incorporação de fármacos nos grupos submetidos a polimerização a plasma foi realizada por imersão das amostras numa solução de clorexidina a 2% em água deionizada durante 30 minutos.

Figura 27 - Reator utilizado na deposição de polímeros à plasma.



(fonte: próprio autor)

3.3 Caracterização das superfícies anodizadas

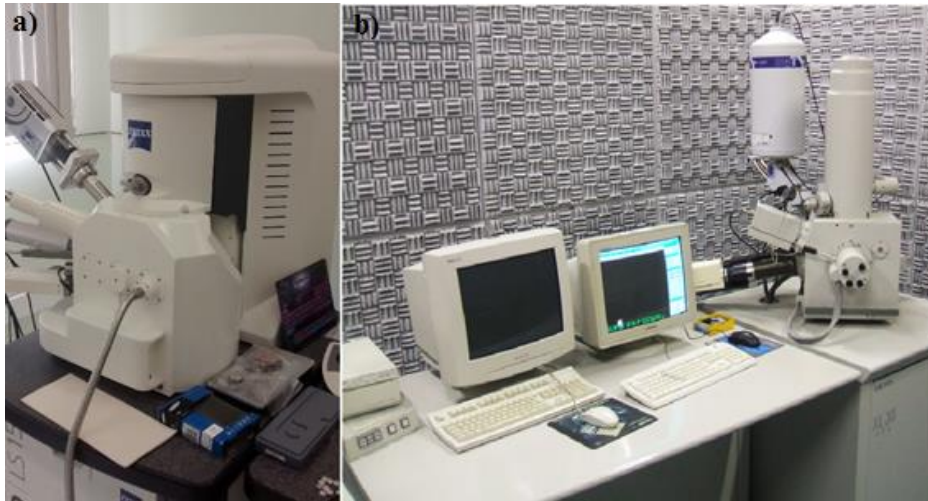
Com o intuito de determinar as condições ideais de crescimento de nanotubos as amostras anodizadas foram submetidas a caracterização de superfícies pelos seguintes métodos:

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos tubos formados sobre as amostras anodizadas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Ao longo do desenvolvimento do trabalho imagens foram coletados por microscópios com filamentos de tungstênio (Zeiss EVO LS15 pertencente ao LAIMat -Laboratório de Imagens de Materiais, Unesp - Guaratinguetá) e field emission gun (FEG) (Philips XL-30 FEG pertencente ao LCE – Laboratório de Caracterização Estrutural, UFSCar). A Figura 28 apresenta ver os equipamentos utilizados.

Figura 28 - Microscópios Eletrônicos de Varredura utilizados na obtenção de imagem. a) Zeiss EVO LS15/LAIMat e b) Philips XL-30 FEG/LCE.

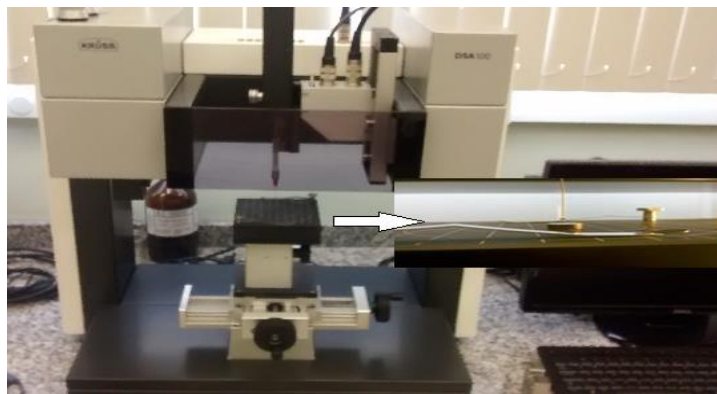


(fonte: próprio autor)

3.3.2 Ângulo de Contato

A alteração da molhabilidade após tratamento superficial foi analisada por medida de ângulo de contato. Para cada medida utiliza-se de 0,5 mL de água destilada gotejada sobre a superfície. Os ensaios foram realizados no Goniômetro modelo DAS 100E, Kruss, Departamento de Materiais e Tecnologia, Unesp. O equipamento, visto na Figura 29, possui uma câmera acoplada que fotografa a gota dispensada e o ângulo fotografado é analisado pelo programa do aparelho. O equipamento ainda permitiu a avaliação de energia de superfície pelo método de Owens-Wendt. Tal método baseia-se na divisão da energia em componentes polares e dispersivas e para tanto necessita de ao menos dois reagentes diferentes. Como líquido apolar em todas as medidas foi utilizado o diiodometano.

Figura 29 - Goniômetro modelo DAS 100E utilizado na avaliação de molhabilidade. Em detalhe uma gota de água deionizada sendo depositada.



(fonte: próprio autor)

3.3.3 Análise de Difração de Raios-X (XRD)

Com objetivo de identificar as fases cristalinas formadas pós oxidação anódica, foi realizada a análise de difração de raios-X. O equipamento utilizado para as análises foi o difratômetro Panalytical, modelo Empyrean, pertencente ao Departamento de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP e pode ser visto na Figura 30. O ângulo de incidência variou de 20° até 90° com velocidade de 0,1°/s.

Figura 30 - Difratômetro Empyrean Panalytical (EEL- USP) no qual as fases cristalinas das amostras foram analisadas.

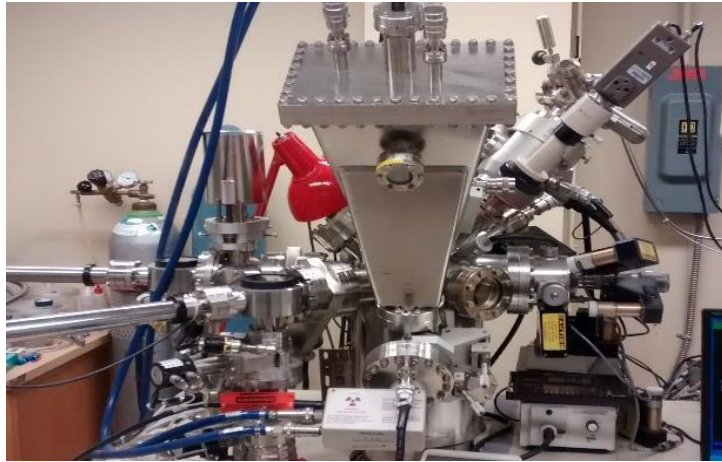


(fonte: próprio autor)

3.3.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

A composição das superfícies das amostras antes e depois dos tratamentos foram estudadas por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) com auxílio do aparelho PHI 5600-ci (Physical Electronics, USA), pertencente ao Laboratório de Biomateriais e Bioengenharia da Université Laval. Para avaliar a homogeneidade das superfícies, em cada amostra varreu-se 3 áreas de 0,01 cm², com ângulo de detecção fixo em 45°. Os espectros foram obtidos utilizando fontes de raio-X de alumínio (1486,6 eV) e magnésio (1253,6 eV) e todas as amostras foram avaliadas a 150 W sem compensação de carga. A Figura 31 mostra o arranjo do aparelho utilizado.

Figura 31 - XPS utilizado para a avaliação da composição superficial das amostras (Laboratório de Biomaterias e Bioengenharia da Université Laval, Canadá).



(fonte: próprio autor)

3.4 Caracterização após recobrimento com filmes poliméricos

As superfícies recobertas por polimerização à plasma e grafitação por NaSS foram avaliadas por medidas de ângulo de contato de maneira idêntica a descrita na avaliação de superfícies anodizadas. Além disso, as amostras submetidas a recobrimento polimérico tiveram suas superfícies avaliadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, pelo o método de refletância total atenuada (modelo PerkinElmer Spectrum 100 mostrado na Figura 32) e por caracterizações específicas descritas à seguir.

Figura 32 - Espectrômetro utilizado para avaliar os revestimentos poliméricos realizados.

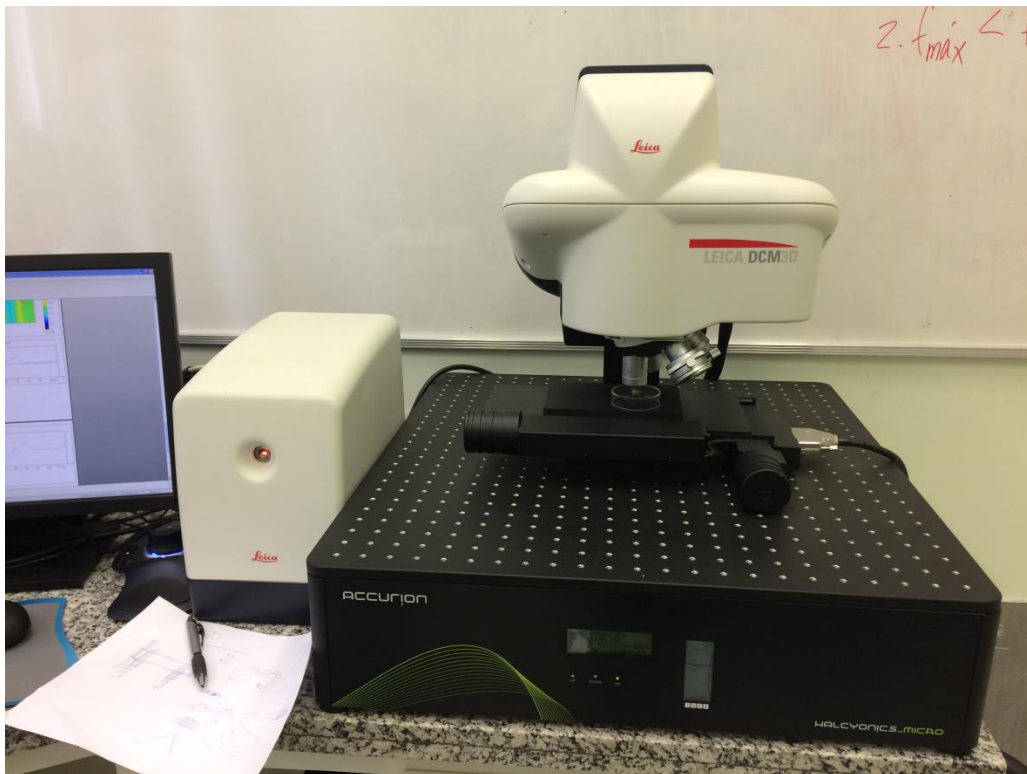


(fonte: próprio autor)

3.4.1 Espessura dos filmes

As espessuras dos filmes de PMOXA foram obtidas empregando microscopia confocal. O método consiste em utilizar uma fita adesiva para vácuo para cobrir parte das amostras durante os tratamentos. Após a deposição dos filmes poliméricos a fita é retirada, formando um degrau entre a região recoberta por polímero e a região antes protegida pela fita, degrau cuja altura pode ser mensurada por microscopia confocal revelando a espessura de polímero. O microscópio utilizado neste ensaio foi confocal Leica DCM8, do laboratório LaiMat, FEG – Unesp e pode ser visto na Figura 33 .

Figura 33 - Microscópio confocal utilizado para avaliação de espessuras dos filmes de PMOXA.



(fonte: próprio autor)

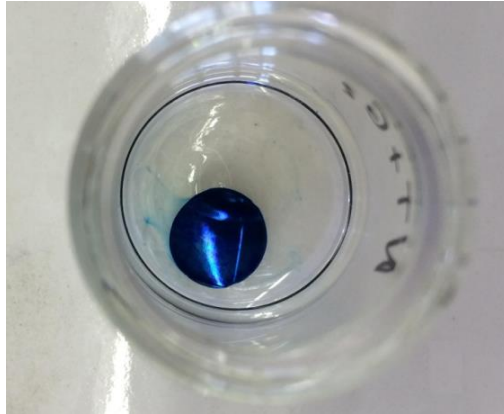
3.4.2 Colorimetria por azul de toluidina

Por incompatibilidade entre o procedimento de grafitação e a técnica de avaliação de espessura utilizada para os outros revestimentos uma técnica alternativa de quantificação de material polimérico depositado foi utilizado para os filmes de poliNaSS, a colorimetria por azul de toluidina (AT).

Esta técnica se baseia na afinidade química entre o poli-NaSS e o azul de toluidina. Após imersão das em solução de colorante (0,5 mol/L) as amostras são mantidas sob agitação

por 6 horas a 30 °C, durante esse tempo cada mol de polímero é combinado à um mol de colorante, o qual pode ser recuperado após lavagem em NaOH (10^{-3} mol/L) e incubação por 24 horas em ácido acético (Figura 34). A concentração de AT na solução recuperada após decomplexação é quantificada por espectroscopia UV-visível (630 nm).

Figura 34 - Superfície de uma amostra após incubação em azul de toluidina.



(fonte: próprio autor)

3.5 Cultura Celular

Essa etapa foi realizada durante estágio na Universidade Paris XIII, sob supervisão da Prof. Dra. Véronique Migonney (FAPESP 2015/26273-9).

Inicialmente foi realizada a cultura celular visando avaliar a biocompatibilidade, proliferação e morfologia de células na superfície da liga antes e após tratamentos de modificação de superfície.

Antes dos ensaios as superfícies foram submetidas a sucessivas lavagens para condicionamento e esterilização.

O processo consiste em 3 lavagens de 3 horas em solução de NaCl 1,5 mol/L, NaCl 0,15 mol/L e tampão fosfato-salino (PBS), entre cada solução as amostras foram lavadas por 10 minutos em água ultra-pura.

Neste ponto as amostras revestida por PMOXA foram submetidas a imersão em medicamentos, como descrito anteriormente e, em seguida, todos os grupos foram submetidas à radiação UV por 15 minutos em cada face e incubadas por 8 horas em meio de cultura α -MEM. Finalmente as amostras são transferidas para placas de poços contendo α -MEM completo (1% penicilina, 1% glutamina, 10% soro fetal bovino) e conservadas até o início dos ensaios.

Em resumo, os ensaios seguintes foram realizados para os seguintes grupos:

- Grupo 1: Ti15Mo
- Grupo 2: Ti15Mo + TNT
- Grupo 3: Ti15Mo + TNT +Poli-NaSS
- Grupo 4: Ti15Mo + TNT +Plasma
- Grupo 5: Ti15Mo + TNT +Plasma+ Clorexidina

Para realização dos ensaios foram escolhidos osteoblastos de linhagem MC3T3-E1 subclone 4, armazenados num congelador a -80°C e descongelados em banho-maria a 37°C antes do procedimento. Para a cultura de células, foram utilizados 10 mL de meio de cultura α -MEM completo. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 48 horas até que a população de células atingisse 70% de confluência. Posteriormente as células foram removidas com 3 mL de tripsina (0,025% de tripsina / EDTA) para a digestão enzimática durante 7 minutos e colocados na incubadora de CO_2 . Finalmente, 7mL de α -MEM completo foram adicionados ao frasco e uma aliquota da suspensão foi retirada para contagem das células. O restante foi transportado para a centrífuga para a separação.

O sobrenadante foi aspirado e as células suspensas no meio de cultura completo de modo a obter uma suspensão a 50.000 células/mL. Assim, 1 mL de solução foram adicionados em cada poço da placa com uma única amostra. As amostras imersas foram armazenadas para crescimento em uma incubadora ($37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$). Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar em condições estéreis, como ilustrado na Figura 35, e utilizando células de passagens entre 3 e 8. Os ensaios foram realizados igualmente sobre o fundo de uma placa de 24 poços como grupo controle negativo.

Figura 35 - Câmara de fluxo laminar utilizada nos ensaios.



(fonte: próprio autor)

3.5.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi estudada por ensaio de MTT após 24 horas de incubação. As amostras foram lavadas 2 vezes em PBS e transferidas para uma placa de 24 poços com 1 mL de PBS por poço sobre as quais foram adicionados 50 µl de solução 5mg/mL de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) em PBS. As amostras foram incubadas durante 4 horas (37 ° C e 5% de CO₂), durante esse período a atividade mitocondrial transforma o colorante em cristais de formazam. Após incubação os poços foram esvaziados e os cristais dissolvidos numa mesa de agitação por 10 minutos pela adição de 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) . A absorbância da solução é medida utilizando um leitor de UV-Vis e comparada a uma curva de calibração construída pela absorbância de suspensões celulares de concentrações conhecidas.

3.5.2 Morfologia celular

A morfologia das células foi examinada após 1, 3 e 7 dias de cultura utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) em modo biológico, o que também permite observar a interação das células e superfícies. As amostras foram retiradas do meio de cultura, lavadas 2 vezes em PBS e as células fixadas através da incubação em solução de formaldeído 4% por 30 min a temperatura ambiente. As amostras são lavadas em água ultra-pura e conservadas a 4 °C até as imagens.

3.5.3 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada por contagem das células (Multisizer III – Coulter Counter Z2 Beckman) após 1, 3 e 7 dias de cultura. Semelhante ao realizado para a avaliação da morfologia as amostras foram retiradas do meio de cultura e lavadas em PBS duas vezes antes de serem transferidas para um novo poço. 1 mL de tripsina foi adicionado em cada poço para a digestão enzimática durante 7 minutos e colocados na incubadora de CO₂. A ação da tripsina foi interrompida por adição de 1 mL de α-MEM completo e a quantidade de células presente por mililitro de suspensão recuperada foi analisada por contagem de partículas entre 10 e 60 µm de diâmetro.

3.5.4 Adesão celular a curto período

Amostras do grupo 1 ao grupo 5 foram avaliadas para adesão celular a curto período e força de adesão célula/superfície. As amostras foram distribuídas em uma placa de 24 poços e incubadas em 1mL de suspensão celular (50.000 células/mL) por 15 minutos. Após esse período cada poço foi esvaziado, as suspensões recuperadas separadamente (N1) e armazenadas a 37 °C. As amostras foram então reposicionadas no centro da placa de 24 poços contendo 1 mL de α -MEM completo em cada poço e submetidas a rotação controlada de forma a criar um esforço cisalhante de 10 dyn/cm² na superfície por 15 minutos. O meio recuperado após a aplicação da força foi igualmente recuperado e armazenado a 37 °C (N2). Enfim, as amostras foram transferidas para outros poços e imersas em 1 mL de tripsina para separar as células aderentes. Mais uma vez a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 1 mL de α -MEM completo e as suspensões resultantes (N3) igualmente armazenadas.

O número de células em cada etapa do ensaio (N1, N2 e N3) foi medida por contagem de partículas. O valor de N1 representa o número de células não aderidas a curto termo, o valor N2 representa o número de células separadas pela força aplicada e N3 o número de células aderidas após aplicação de força.

A adesão a curto termo é dada então pelo seguinte formula:

$$\%A_{15} = (N2+N3)/(N1+N2+N3)$$

De mesmo modo que a intensidade da força de adesão entre as células e a superfície pode ser indiretamente medida pela porcentagem de células aderidas ao fim do experimento:

$$\%A = N3/(N2+N3)$$

3.5.5 Diferenciação celular

Buscando simular o comportamento das células no processo de osseointegração, amostras dos grupos 1 a 3 foram avaliadas para diferenciação celular. Tal estudo foi conduzido em duas etapas: formação da enzima alcalina fosfatase e mineralização.

É sabido que células osteoblasticas não são capazes de produzir *in vitro* cálcio ou fosfato, portanto para as seguintes séries de experimentos o meio de cultura α -MEM completo usado anteriormente foi enriquecido pela adição de ácido ascorbico (16,1 mg/l) e β -glicerolfosfato (2,16 g/l).

3.5.5.1 Fosfatase Alcalina (ALP)

A presença da enzima fosfatase alcalina é uma indicação primária da diferenciação de células ósseas, uma vez que sua ação permitira a deposição de cálcio e fosfato e formação óssea inicial.

Para a realização do ensaio, após 14 e 21 dias de cultura as amostras foram lavadas 2 vezes em PBS e transferidas para um novo poço contendo 1 mL de solução tampão triz -triton x100 (1,6 g de NaCl, 0,4844 g de Trizma Base, 2 mL de Triton – x100 e 198 mL de água deionizada). As amostras foram levadas a agitação por 1 hora a temperatura ambiente para separar a ALP da membrana celular.

As suspensões resultantes foram transferidas para tubos de ensaio e fortemente agitadas antes de serem congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongeladas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após repetir o processo por 3 vezes 500 μL de suspensão de cada tubo foram misturados com 500 μL de solução para-nitrofenilfosfato 20 mM (0,742 g de p-nitrofenilfosfato, 0,0407 g de MgCl_2 , 0,0891 g de 2-amino-2-metil-propanol e 100 mL de água deionizada) e incubados por 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A ação da enzima ALP hidrolisa o p-nitrofenilfosfato produzindo p-nitrofenol de coloração amarelada, permitindo a quantificação por absorvância a 405 nm contra uma curva de concentração conhecida de p-nitrofenol.

A quantidade de ALP produzida foi normalizada pela concentração total de proteínas na suspensão, medida com o auxílio do kit comercial Bio-Rad protein assay. O ensaio baseia-se no método de Bradford e a mudança de coloração de colorantes em presença de proteínas. No caso específico desse kit, 200 μL da suspensão foram adicionados a 1mL de colorante e a absorção medida a 595 nm contra uma curva de concentração conhecida de proteínas.

3.5.5.2 Mineralização

Finalmente, a diferenciação também foi avaliada por mineralização. Para tanto foram avaliadas deposições de cálcio e fosfato após 21 e 28 dias de cultura.

Inicialmente as amostras foram lavadas duas vezes em PBS, transferidas para um novo poço contendo 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 15% (m/v) e agitadas por 1 hora a temperatura ambiente.

Em seguida 10 μL de cada poço foram adicionados a 1 mL de solução de arsenazo III (0,2 mM em PBS) e mantidos em repouso por 15 minutos. A quantidade de cálcio presente pode ser determinada por absorção UV-vis a 650 nm contra uma curva de concentrações de Ca^{2+} conhecidas.

Para a avaliação da quantidade de fosfato presente o restante das suspensões foram mantidas em agitação por mais 48 horas para em seguida terem 100 ul prelevados e adicionados a 400 ul de acetona, 200 ul de ácido sulfurico 2,5 mol/L , 200 ul de molibdato de amonia 10 mM e 80 ul de ácido citrico 1 mol/L. A suspensão resultante foi fortemente agitada e incubada por 30 min. A concentração de fosfato pode ser avaliada por absorção na região ultravioleta (355 nm) contra uma curva de concentrações de PO_4^- conhecidas.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das superfícies anodizadas

A caracterização das superfícies anodizadas e a definição da condição de potencial ideal para a anodização da liga foram definidas pelos resultados das seguintes análises:

4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos nanotubos de TiO₂ foi avaliada para os potenciais de 5, 10 e 20V, para período de 24 horas de anodização. Todas as superfícies foram calcinadas a 450 °C por 1 hora após oxidação anódica. Na Figura 36 é possível observar a morfologia de topo e secção transversal dos nanotubos de TiO₂.

Pode ser constatado pelas imagens que houve formação homogênea de nanotubos em toda a superfície das amostras, independente do potencial. No entanto é importante ressaltar que a alteração do potencial de anodização levou à modificação na morfologia dos tubos. A formação de nanotubos de TiO₂ em ligas do sistema binário Ti-Mo na presença de eletrólito de NH₄F/glicerol foi verificada por Chaves et al. (2016). Com a ajuda do software de processamento de imagens ImageJ, as dimensões de diâmetro, altura e espessura da parede dos tubos foram quantificadas. Os resultados são expostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dimensões dos nanotubos para diferentes condições de oxidação anódica.

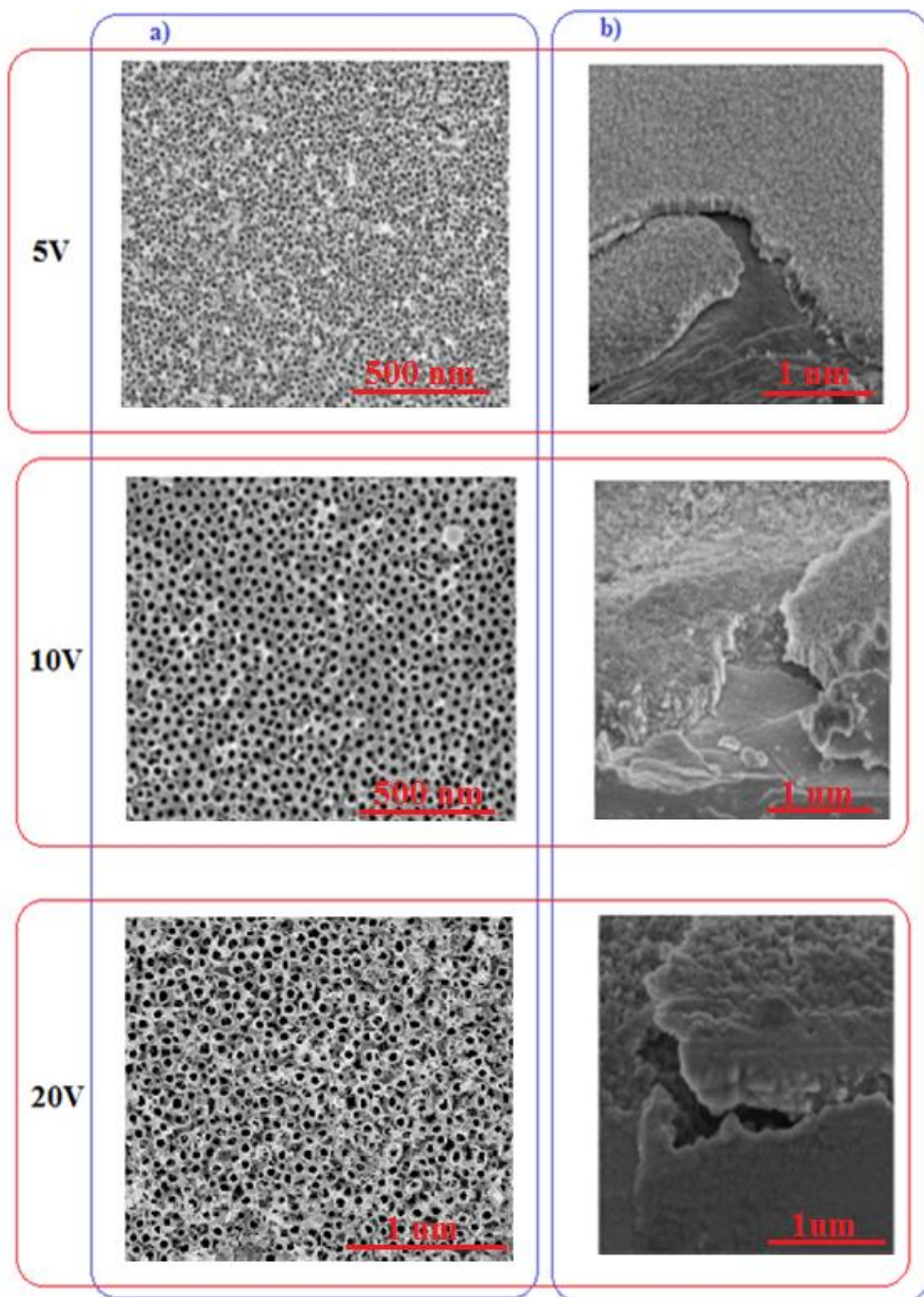
Potencial (V)	Espessura (nm)	Diâmetro interno (nm)	Parede do nanotubo (nm)
5	97,95±8,38	11,81±1,87	7,75±0,69
10	164,39±11,85	23,27±3,55	10,91±1,79
20	209,67±7,51	40,89±5,87	9,57±0,85

(fonte: próprio autor)

Os resultados indicaram uma relação de proporcionalidade entre potencial de anodização, o diâmetro interno e espessura dos nanotubos, o que confirma a tendência reportada na literatura (KULKARNI, 2015; LOCKMAN, 2010).

Anodizações realizadas sobre Ti-cp com eletrólitos a base de NH₄F (KHUDHAIR, 2016) mostram valores de diâmetro interno superiores aos encontrados neste estudo, entre 30 e 170 nm de diâmetro para potenciais entre 10 e 70V contra 12 e 41 nm para potenciais de 5 a 20V. Tal resultado pode ser explicado pelo comportamento de ligas no processo de anodização o qual tende a ser diferente pela influência dos elementos de liga na resistência a corrosão do material final. Contudo, a possibilidade de ajuste do tamanho do tubo por mudança no potencial de oxidação anódica é um fator extremamente importante e que pode impactar diretamente a proliferação celular.

Figura 36 -Micrografias de Microscópio Eletrônico de Varredura de emissão de campo para amostras tratadas a 5 V, 10 V e 20 V. a) Vista frontal, b) Vista de um corte lateral.



(fonte: próprio autor)

4.1.2 Ângulo de Contato e Energia de Superfície

A molhabilidade é um fator primordial para o espalhamento celular e proliferação eficaz *in vitro*. O ângulo de contato foi medido pelo método da gota séssil, utilizando uma gota de 1 μ l de água deionizada. Para medidas de energia de superfície di-iodometano foi utilizado como componente apolar. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de ângulo de contato e energia de superfície para diferentes condições de anodização.

	Controle	5V	10V	20V
Ângulo de Contato (°)	72,08 \pm 0,80	3,72 \pm 0,39	3,12 \pm 0,07	11,63 \pm 1,83
En. de Superfície (mN/m)	46,64 \pm 0,42	86,65 \pm 0,04	86,75 \pm 0,01	85,42 \pm 0,37

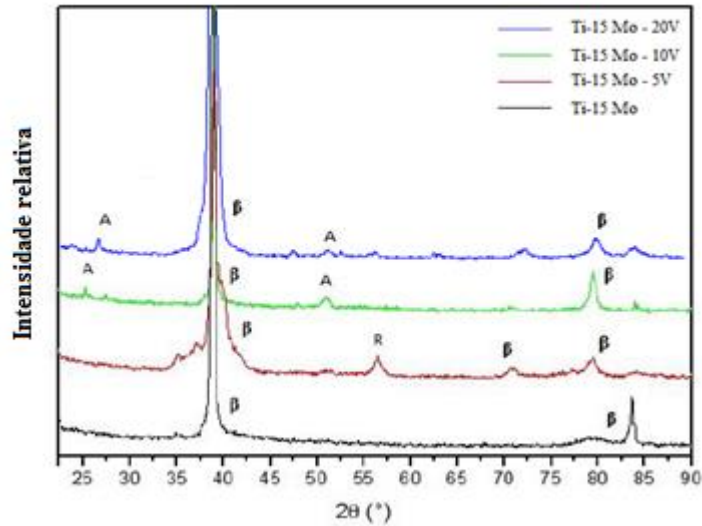
(fonte: próprio autor)

Como pode ser observado, o crescimento de nanotubos ocasionou mudança substancial na hidrofiliabilidade da superfície independente da tensão utilizada. Apesar da liga Ti15Mo já apresentar ângulo de contato inferior a 90°, o que a caracteriza como hidrofílica, depois do tratamento a molhabilidade é consideravelmente maior, chegando a redução de 95% do valor original do ângulo para a condição de 10V tornando-a superhidrofílica. Por outro lado, a medida da energia superficial quase duplicou o seu valor para todas as condições experimentais. Este aumento da energia já foi verificado por outros pesquisadores (BALLA, 2010) e é relatado como um diferencial positivo no crescimento celular (ALTANKOV, 1996).

4.1.3 Análise de Difração de Raios-X

As condições de 5, 10 e 20 V foram submetidas a análise de difração de raios-X. Como pode ser verificado na Figura 37, além dos picos referentes a fase β , característica da liga Ti15Mo (HO et al., 1997), foi possível verificar a existência de duas fases distintas do dióxido de titânio dependendo do valor do potencial de oxidação. Enquanto as amostras anodizadas a 5V apresentaram óxido na fase rutilo, os grupos tratados a 10V e 20V foram predominantemente recobertos por óxido de fase anatase. A mudança de fase dos nanotubos de diferentes diâmetros já havia sido verificada na literatura e os resultados obtidos para as condições estudadas vão inteiramente ao encontro a tais estudos (BAUER, 2011). A ocorrência da estrutura anatase no óxido da superfície é fortemente desejável para aplicações biomédicas, pois segundo Uchida et al. (2003) induz a formação de apatita na superfície do implante, auxiliando sua osseointegração.

Figura 37 - Espectros de raios-X obtidos após oxidação anódica da liga Ti15Mo para 5, 10 e 20 V por 24 horas. Todas as amostras anodizadas foram submetidas à calcinação a 450° C por 1 hora.

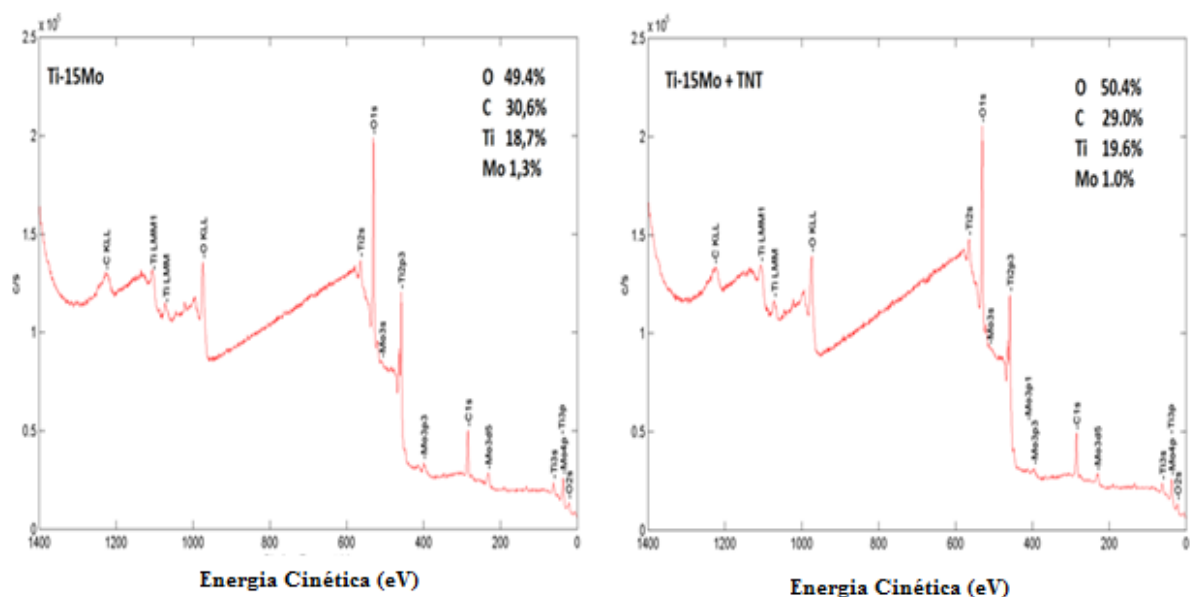


(fonte: próprio autor)

4.1.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X

A fim de avaliar detalhadamente a composição superficial após o tratamento de oxidação anódica, as amostras foram submetidas à espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X. A Figura 38 representa os espectros obtidos para corpos de prova da liga Ti15Mo antes e após oxidação anódica.

Figura 38 - Varredura XPS da liga Ti15Mo antes e após crescimento de nanotubos.

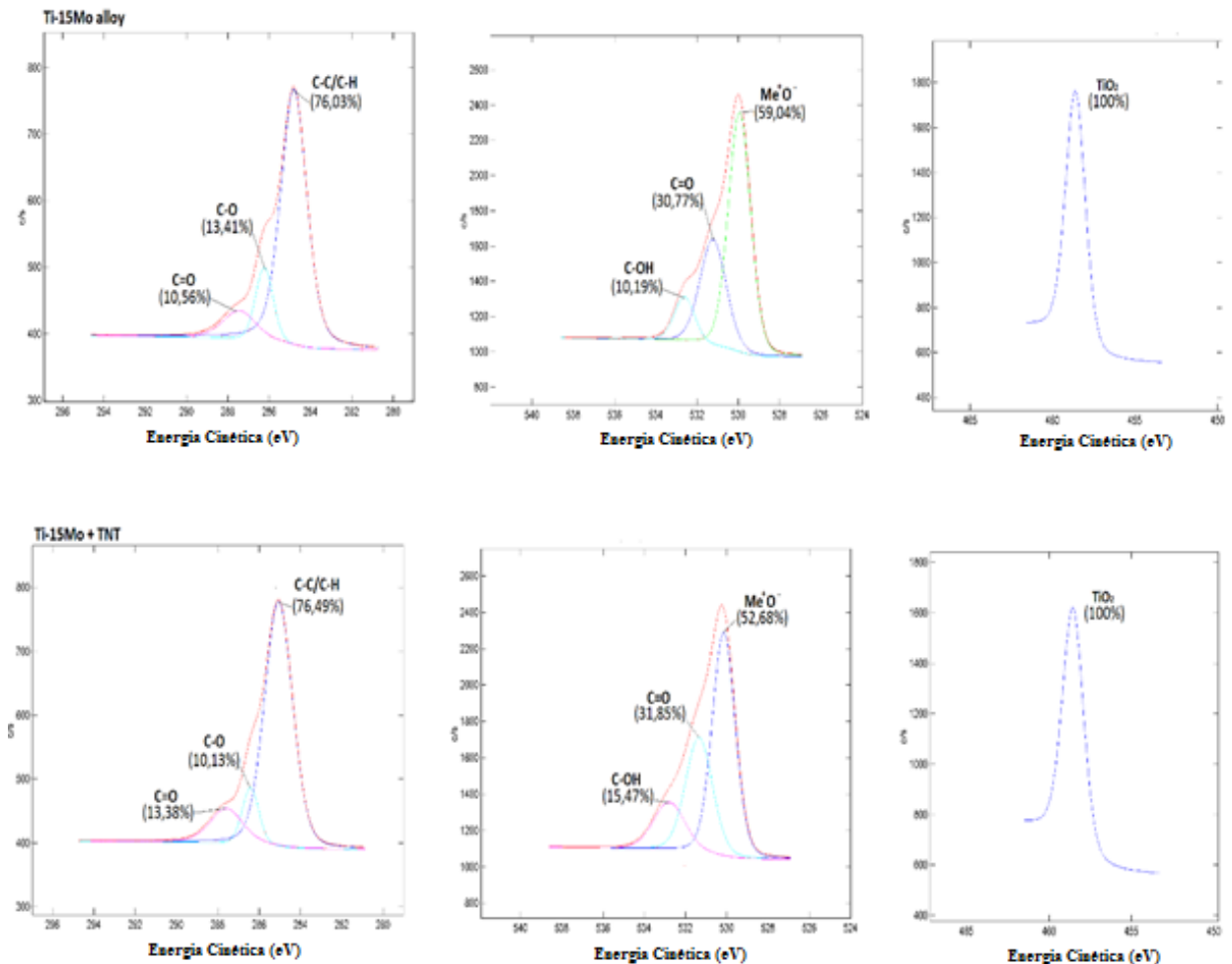


(fonte: próprio autor)

Ainda que os valores de Ti e Mo não possam ser comparados ao espectro de nanotubos sobre Ti-cp a relação oxigênio/carbono se mostrou próxima do encontrado para nanotubos crescidos neste caso (KULKARNI, 2015). Ainda pode ser visto que não houve variação significativa da composição superficial após o crescimento de nanotubos de TiO_2 , o que indica que a composição química é a mesma do óxido original, sem adição de elementos presentes no eletrólito, se destacando a ausência de fluor, o qual deve se eliminado dos nanotubos cristalizados em temperaturas acima de $400\text{ }^\circ\text{C}$ (MINAGAR, 2013).

A distribuição das ligações também não sofreu mudança significativa, como pode ser observado a partir da análise dos espectros de alta resolução exposta na Figura 39.

Figura 39 - Espectros de alta resolução para C, O e Ti da superfície da liga Ti15Mo antes e depois da oxidação anódica.



(fonte: próprio autor)

Confirmando os resultados da análise inicial, a combinação dos picos Ti a 458,4eV e O a 530eV nos espectros de alta resolução indicou que praticamente todo titânio encontrado na superfície está na forma de óxido TiO_2 , eliminando a hipótese de formação de um composto metálico secundário. Ainda foi possível verificar que a porcentagem de oxigênio em forma de óxido não teve variação significativa, o que sugere que a fórmula estequiométrica do óxido é a mesma, antes e depois do tratamento de ionização.

Diante do resultado positivos tanto para morfologia, quanto para molhabilidade e energia de superfície e principalmente devido a presença da fase anatase, mais desejável em aplicações biológicas, a condição de anodização de 10V por 24 horas foi escolhida como condição ótima para o prosseguimento do trabalho e as amostras tratadas nesta condição foram utilizadas como substratos para o revestimento polimérico.

4.2 Caracterização da superfície após recobrimento polimérico

4.2.1 Método Físico: Polimerização a Plasma

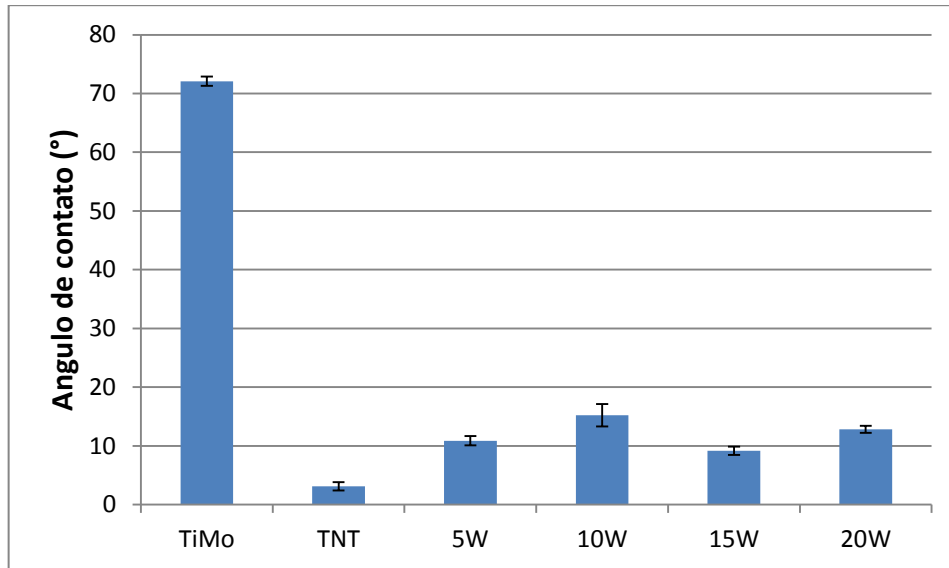
Inicialmente foram realizados ensaios para determinação da condição ideal de deposição dos filmes. O parâmetro escolhido para variação foi a potência aplicada sobre o plasma gerador dos filmes de PMOXA (PECVD).

Antes do tratamento de amostras anodizadas uma série de deposições foi realizada em lamínulas de vidro e folhas de alumínio. Tal procedimento foi empregado por maior facilidade de caracterização e obtenção de destes substratos em comparação a liga anodizada. As deposições foram realizadas com diferentes potências (5W, 10W, 15W e 20W) e foram avaliadas a molhabilidade, a composição química e a espessura dos filmes.

4.2.1.1 Escolha dos parâmetros para deposição a plasma

A molhabilidade dos filmes foi avaliada pelo método da gota séssil, utilizando água deionizada sobre filmes depositados inicialmente nas superfícies de lamínulas de vidro para 5W, 10W, 15W e 20W de potência de deposição. Os resultados são expostos na Figura 40.

Figura 40 - Gráfico de barras representando o ângulo de contato de superfícies após o crescimento de filmes a plasma em diferentes potencias de deposição.



(fonte: próprio autor)

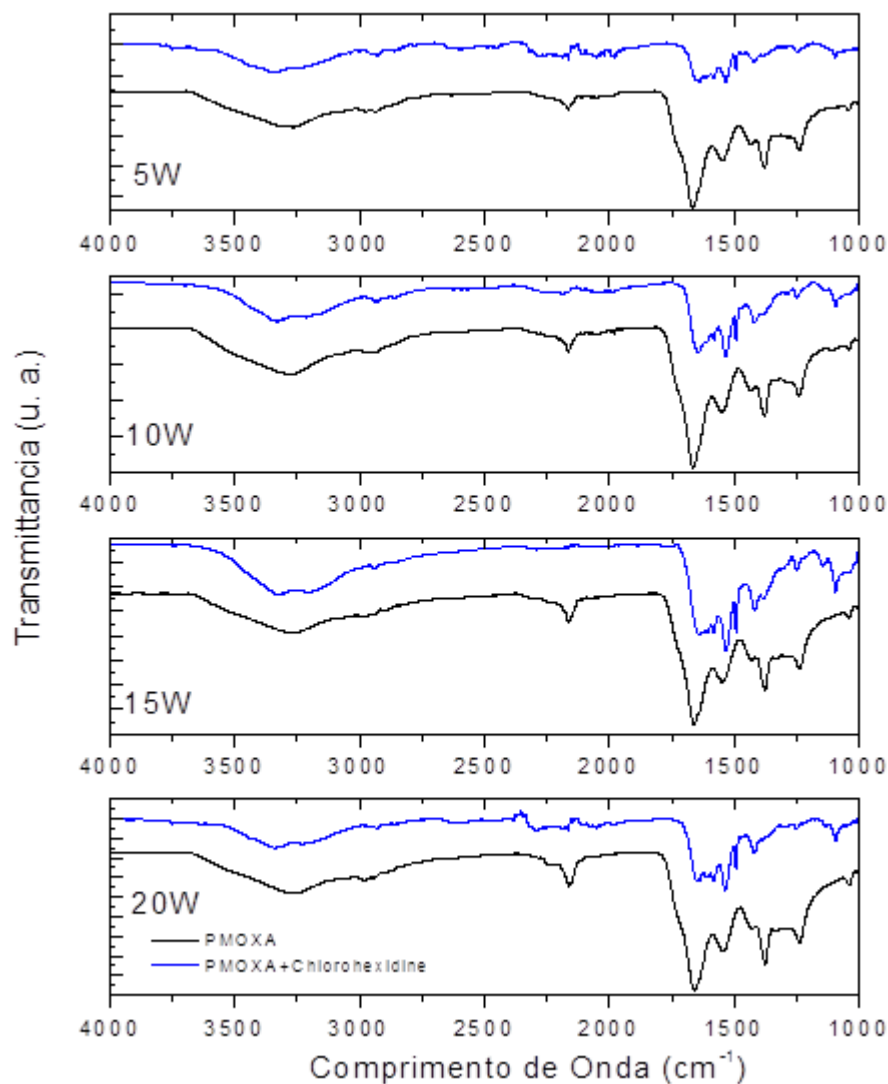
Como pode ser observado o filme apresentou uma ligeira variação entre as condições de deposição, com o ângulo de deposição variando entre 9 e 15°. Estudos realizados apontam valores entre 10° e 40° para curto tempo de deposições abaixo de 10 minutos (Macgregor-Ramiasa, 2015) e entre 10° e 25° para deposições entre 10 e 30 minutos (Zanini, 2016). A diminuição do ângulo encontrado neste trabalho pode ser atribuída a quebra do anel de oxazolina devido ao maior tempo de tratamento (60 minutos). Este comportamento foi verificado, em outra escala, por Zhang et al. (2009). De maneira geral o comportamento das superfícies para todas as condições avaliadas é viável para as aplicações desejadas, na medida que se confirmou as características hidrofílicas dos filmes independentemente da potência utilizada.

Assim como realizado para ângulo de contato, a estrutura molecular dos filmes obtidos para 5W, 10W, 15 W e 20W foi avaliada.

Os espectros são semelhantes para todas as potências avaliadas, com ligeira variação na intensidade do sinal de acordo com a potência, o que pode ser atribuído a maior quebra de moléculas em potencias mais elevadas. A banda larga visualizada na região entre 3200 e 3700 cm^{-1} é associada a ligações O-H, geralmente decorrente de hidratação do filme em contato com o ar, em seguida observa-se um pico a 2200 cm^{-1} , atribuído ao grupo $\text{C}\equiv\text{N}$ formado durante a polimerização em ambiente rico em nitrogênio, como o propiciado pelo monômero. Outros grupos nitrogenados como $\text{C}=\text{N}$ e N-H podem ser observados em 1650 e 1550 cm^{-1} respectivamente. Destaca-se também os picos observados nas regiões de 1370 cm^{-1}

(dobramento C-H) e 1130 cm^{-1} (C-O). A presença desses picos também havia sido detectada por Macgregor-Ramiasa (2015) em seus estudos de polimerização do PMOXA. Os espectros ainda confirmam a teoria proposta como razão da diminuição do ângulo de contato, uma vez que não foram encontrados picos referentes a estruturas orgânicas cíclicas. Todos os filmes avaliados por essa técnica foram depositados sobre folhas de alumínio espelhadas e os espectros obtidos são representados na Figura 41.

Figura 41 - Espectros FTIR para filmes de PMOXA depositados em diferentes potências antes e após imersão por meia hora em solução de clorexidina.



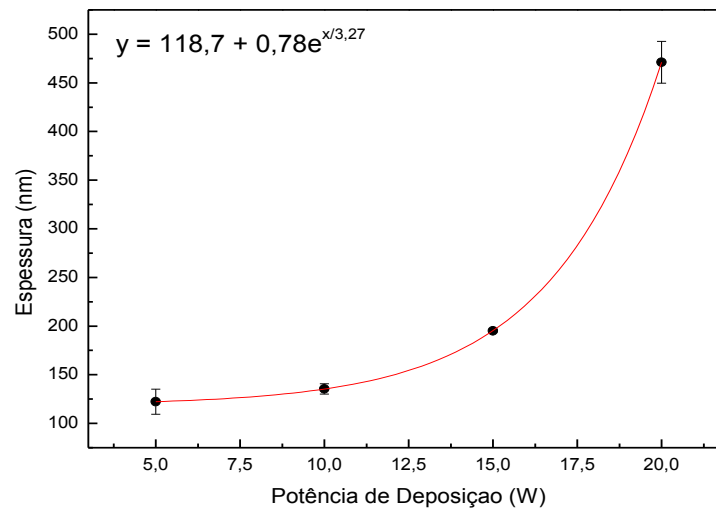
(fonte: próprio autor)

Utilizando-se da mesma técnica amostras imersas em clorexidina foram avaliadas, buscando investigar possíveis interações entre o filme e o medicamento. Após a imersão em solução de clorexidina, mais uma vez nota-se grande semelhança entre os espectros seja qual

for a condição de deposição do filme imerso, porém é visível que o medicamento está presente na superfície, tanto pela atenuação do pico correspondente ao grupo $C\equiv N$, quanto pela diferença entre o novo espectro e o original na região entre 1300 e 1650 cm^{-1} . Tal mudança pode ser atribuída a superposição dos picos relacionados ao medicamento, em especial $C=N$ em 1650 cm^{-1} , o grupo fenol na região de 1550 cm^{-1} e $C-C$ em 1400 cm^{-1} (Campbell et al.. 2000).

A microscopia confocal foi empregada para avaliar a espessura do filme formado. Empregando uma fita adesiva para vácuo parte de lamínulas de vidro foram cobertas durante a deposição dos filmes a plasma. Após a deposição a fita foi retirada, formando um degrau entre a região com filme e a região antes protegida pela fita, degrau cuja altura pode ser mensurada por um microscópio confocal. Todas as condições de deposição estudadas foram avaliadas por esta técnica realizando-se diversas medidas ao longo do degrau. A tendência da relação potência espessura do filme é apresentada na Figura 42.

Figura 42 - Evolução da espessura dos filmes de PMOXA depositados de acordo com a potência de deposição.



(fonte: próprio autor)

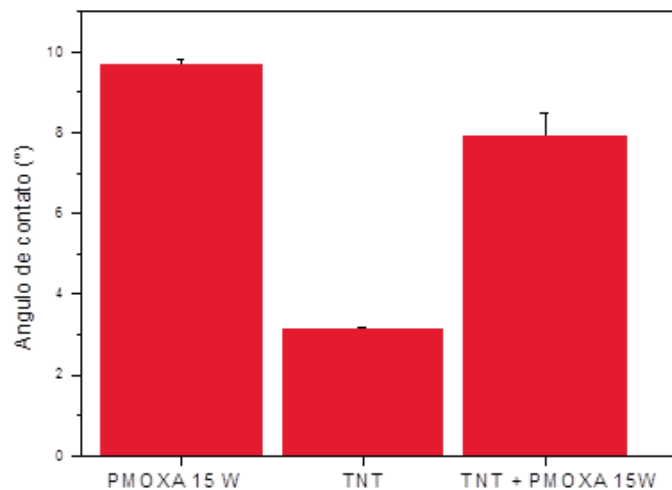
Como é comum em deposições de polímeros a plasma a espessura do filmes aumentou com o aumento de potência de deposição, variando entre 70 e 480 nm aproximadamente. Zanini et al. (2016) encontrou um comportamento parecido (espessuras entre 100 e 450 nm) para experimentos realizados na polimerização a plasma de oxazolina, aplicando porém potências de deposição entre 5 e 80 W . A obtenção de filmes mais espessos em potências

menores esta ligada ao maior tempo de tratamento utilizado neste estudo (60 minutos). Este comportamento é habitual em deposições a plasma (Chen, 2008; Hayakawa, 2004) e pode ser explicado pelo aumento do tempo proporcionar maior número de colisões entre as partículas do plasma. Com ajuda do software OriginPro, foi possível construir uma curva de tendência e, sabendo-se que filmes muito espessos tendem à ter menos adesão, podemos limitar a potência de deposição à 20W.

4.2.1.2 Interação filme/Superfície anodizada

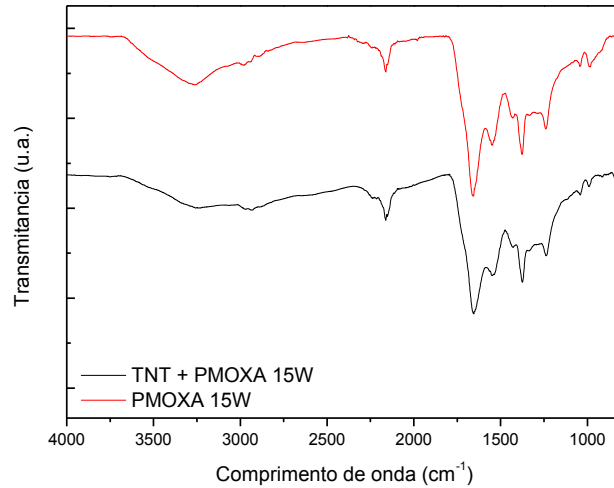
A partir da análise da espessura, ângulo de contato e composição dos filmes produzidos a 15W, esta condição foi escolhida para avaliação da interação entre o filme e o substrato anodizado. Amostras de Ti15Mo anodizadas a 10V foram então submetidas ao recobrimento por plasma e avaliadas quanto a estrutura molecular e molhabilidade. As Figuras 43 e 44 mostram a comparação entre os efeitos alcançados para filmes depositados sobre amostras anodizadas e superfícies usadas para caracterização preliminar.

Figura 43 - Valores de ângulos de contato obtidos pelo método da gota séssil de superfícies anodizadas e lamínulas de vidro revestidas por filme de PMOXA.



(fonte: próprio autor)

Figura 44 - Espectros FTIR dos filmes de PMOXA depositados sobre superfícies anodizadas e folhas de alumínio.



(fonte: próprio autor)

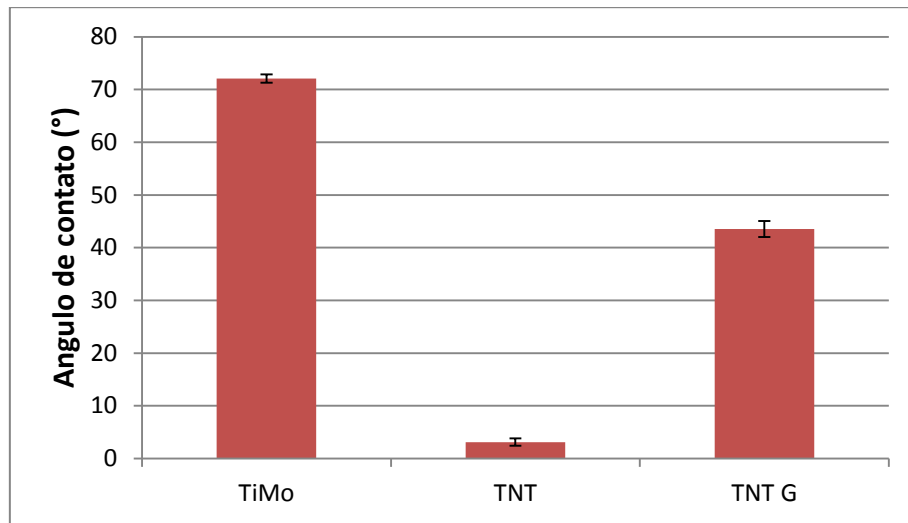
Observa-se que o valor do ângulo de contato das superfícies anodizadas e revestidas por PMOXA é intermediário entre as somente anodizadas e as lamínulas de vidro revestidas, o que permite hipotetizar que mesmo que o filme tenha revestido a superfície a morfologia e a rugosidade dos nanotubos ainda interfere na molhabilidade da superfície.

Analisando os resultados obtidos é possível ainda inferir que o filme não interage quimicamente com a superfície anodizada, uma vez que o espectro FTIR não apresenta mudanças entre os substratos de alumínio metálico e Ti15Mo anodizado.

4.2.2 Método químico: grafitação por NaSS

A molhabilidade das amostras grafitizadas foi avaliada empregando ângulo de contato pelo método da gota séssil. Os valores foram comparados com aqueles obtidos para amostras da liga Ti15Mo polidas e após anodização. A Figura 45 representa os valores de ângulo para os grupos avaliados.

Figura 45 - Comparação entre ângulo de contato pelo método da gota séssil para amostras polidas (TiMo), anodizadas (TNT) e grafitizadas (TNT G).

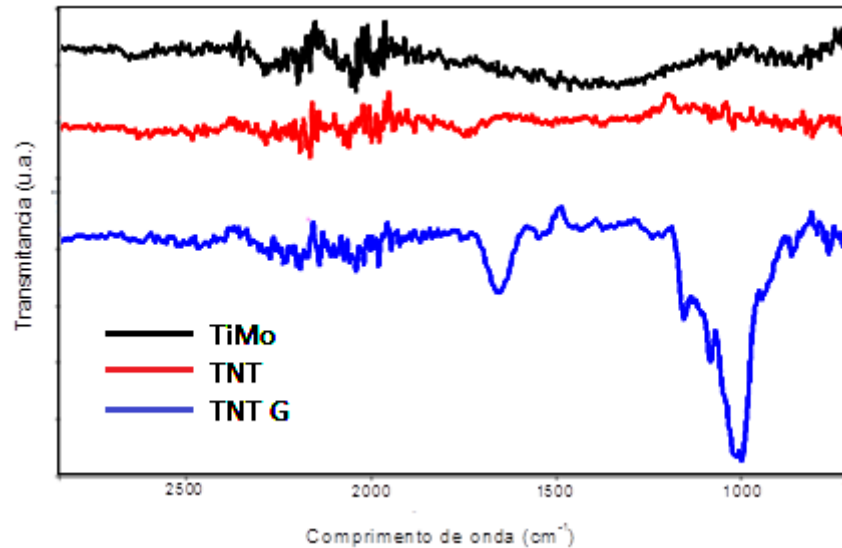


(fonte: próprio autor)

Conforme esperado, a superfície da liga polida apresentou maior valor de ângulo de contato (72°), seguida pela amostra grafitizada (43°) e contendo nanotubos (4°). A mudança do valor de ângulo de contato verificada na amostra grafitizada confirma a eficiência do processo e também foi verificado por Ben Aissa et al. (2011) e Vasconcelos et al. (2014) após grafitização de ligas de titânio e pode ser atribuída sobretudo a mudança na química de superfície com inserção de grupos polares presentes no polímero grafitizado. Apesar do valor obtido ser superior ao verificado nas superfícies contendo nanotubos de TiO_2 a superfície ainda apresenta caráter hidrofílico ($\Theta < 90^\circ$).

Os grupos funcionais presentes nas superfícies grafitizadas foram avaliados empregando FTIR. Superfícies polidas e contendo nanotubos de TiO_2 foram empregados para comparação como visto na Figura 46.

Figura 46 - Espectros FTIR-ATR de amostras de Ti15Mo, Ti15Mo após crescimento de nanotubos e Ti15Mo após crescimento de nanotubos e grafitização.

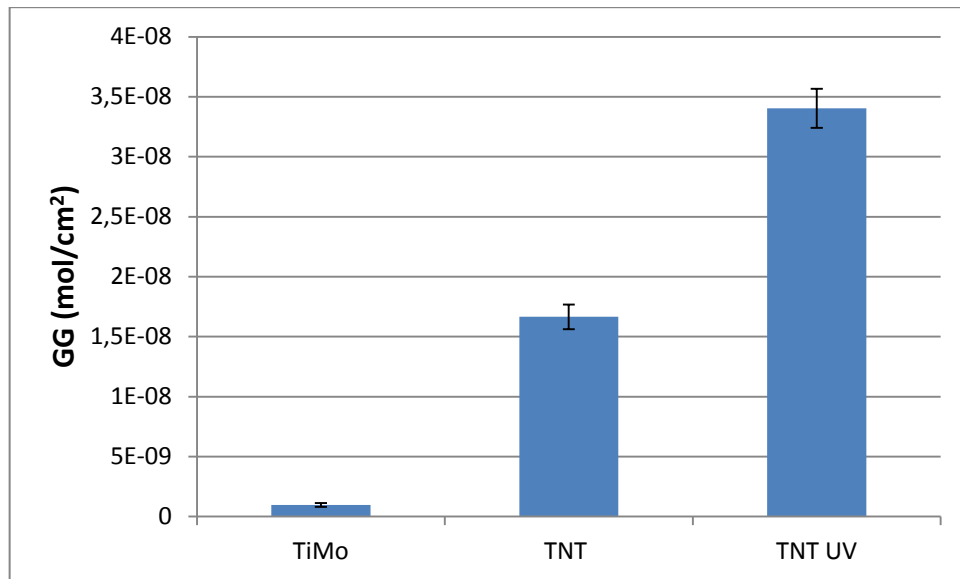


(fonte: próprio autor)

Mais uma vez o ensaio confirma alteração da superfície após grafitização com aparecimento de diversos picos não presentes nos outros grupos. Dentre elas se destaca o duplo pico 1010 e 1040 cm^{-1} representando respectivamente o anel aromático e o grupamento SO_3^- presentes na estrutura de NaSS (ALCHEIKH 2013; HÉLARY 2009). O pico na região de 1650 cm^{-1} também foi verificado por Felgueiras et al. (2015) em seus trabalhos sobre grafitização e pode ser relacionado ao grupo C=C do anel aromático e comprovando a existência de filme de PoliNaSS na superfície.

A Figura 47 representa uma medida indireta do grau de grafitização das amostras dos grupos polido, anodizado e grafitados, expondo o número de mols de azul de toluidina liberados por imersão em solução de ácido acético, o qual em condições ideais equivale ao número de mols de NaSS incorporados na superfície.

Figura 47 - Medida da eficiência de polimerização do NaSS sobre amostras de Ti15Mo, TNT e TNT grafitizado.



(fonte: próprio autor)

Pode-se observar que em superfícies polidas e grafitizadas ocorreu a absorção não específica de azul de toluidina. Para as primeiras tal absorção representa valores desprezíveis (menores que 1 nmol), o que não se pode dizer das superfícies anodizadas onde as taxas encontradas foram bem mais expressivas, sem contudo, ultrapassar a metade do valor obtido para amostras grafitizadas.

A absorção não específica por nanotubos ainda não foi investigada na literatura, mas todas as evidências levam a crer que tal fato deve-se sobretudo a estrutura tubular que aprisiona a molécula do colorante e apresenta uma superfície efetiva muito maior que em amostras polidas, possibilitando maior interação.

Em todo caso, a diferença média entre amostras somente anodizadas e amostras grafitizadas é superior a 20 nanomols, o que se traduz por valores na casa de $3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, maiores que previamente encontrados para procedimentos similares em ligas polidas (VASCONCELOS 2013; CHOURFA 2016) o que mais uma vez pode ser atribuída a grande superfície efetiva dos nanotubos e consequente maior área para grafitização do polímero.

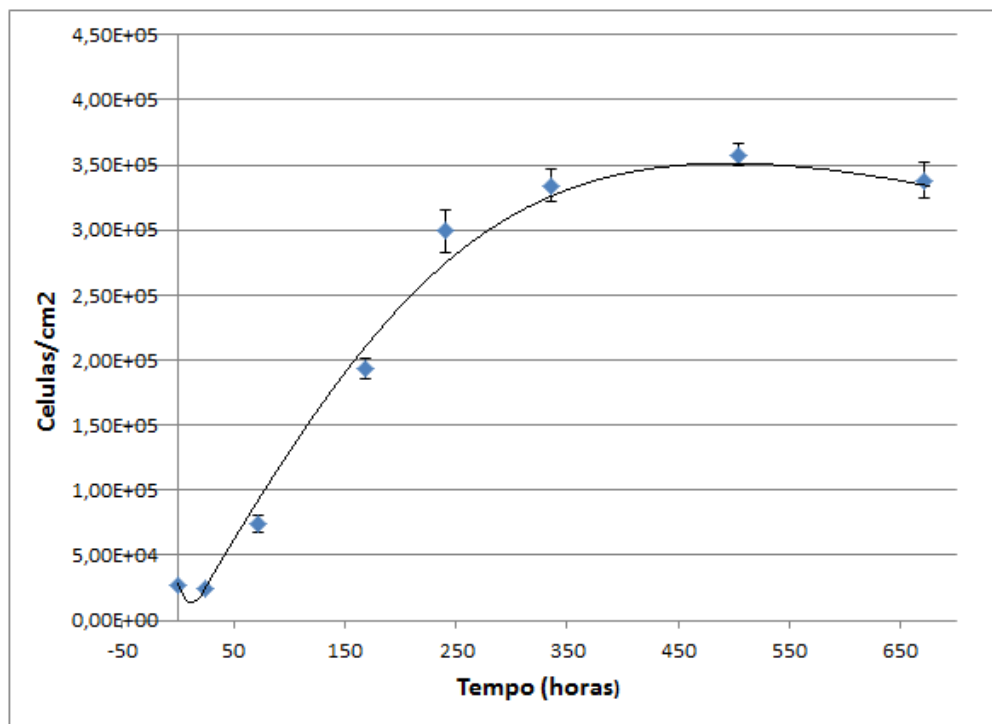
Todos esses resultados levam a crer que o crescimento de nanotubos não somente substitui a oxidação química necessária em superfícies planas mas também pode representar uma melhora no método original de grafitização.

4.3 Estudos *in vitro*

4.3.1 Linhagem celular e curva de crescimento

Todos os experimentos celulares apresentados neste capítulo foram realizados com células osteoblastiscas da linhagem MC3T3-E1 subclone 4. Levando em consideração os diferentes ensaios, número e forma das amostras, todos os ensaios foram realizados em placa de 24 poços padrão, contendo uma amostra e 1 mL de suspensão 50.000 células/mL por poço. Placas de 24 poços sem amostras foram usadas como grupo controle em cada ensaio e todos os ensaios foram realizados em triplicata. O tempo de incubação variou de acordo com a análise, entre 15 minutos e 28 dias (considerado aproximadamente 670 h). A Figura 48 mostra a curva de crescimento das células na placa de 24 poços sem amostras para o intervalo estudado.

Figura 48 - Curva de crescimento de células da linhagem MC3T3-E1 subclone 4 a densidade de semeio 50.000 células por poço.



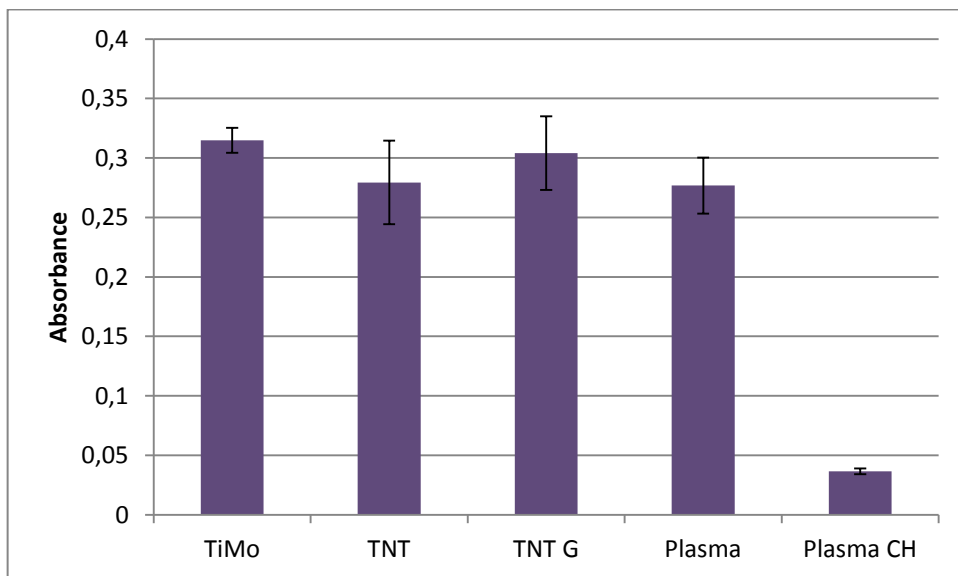
(fonte: próprio autor)

A curva apresenta o perfil esperado com fase de latência nas primeiras 24 horas, fase exponencial na primeira semana (tempo de duplicação de 30 horas), fase de desaceleração na segunda semana e atingindo a fase estacionária entre a terceira e quarta semana.

4.3.2 Viabilidade celular por metil tiazol tetrazolium (MTT)

A viabilidade celular e citotoxicidade foi avaliada após 24 horas de cultura através de teste MTT. A absorbância traduz a taxa de redução de sal de tetrazolium em cristal de formazam por atividade mitocondrial das células. Os resultados podem ser verificados na Figura 49.

Figura 49 - Absorbância medida após teste de MTT sobre as diversas superfícies avaliadas.



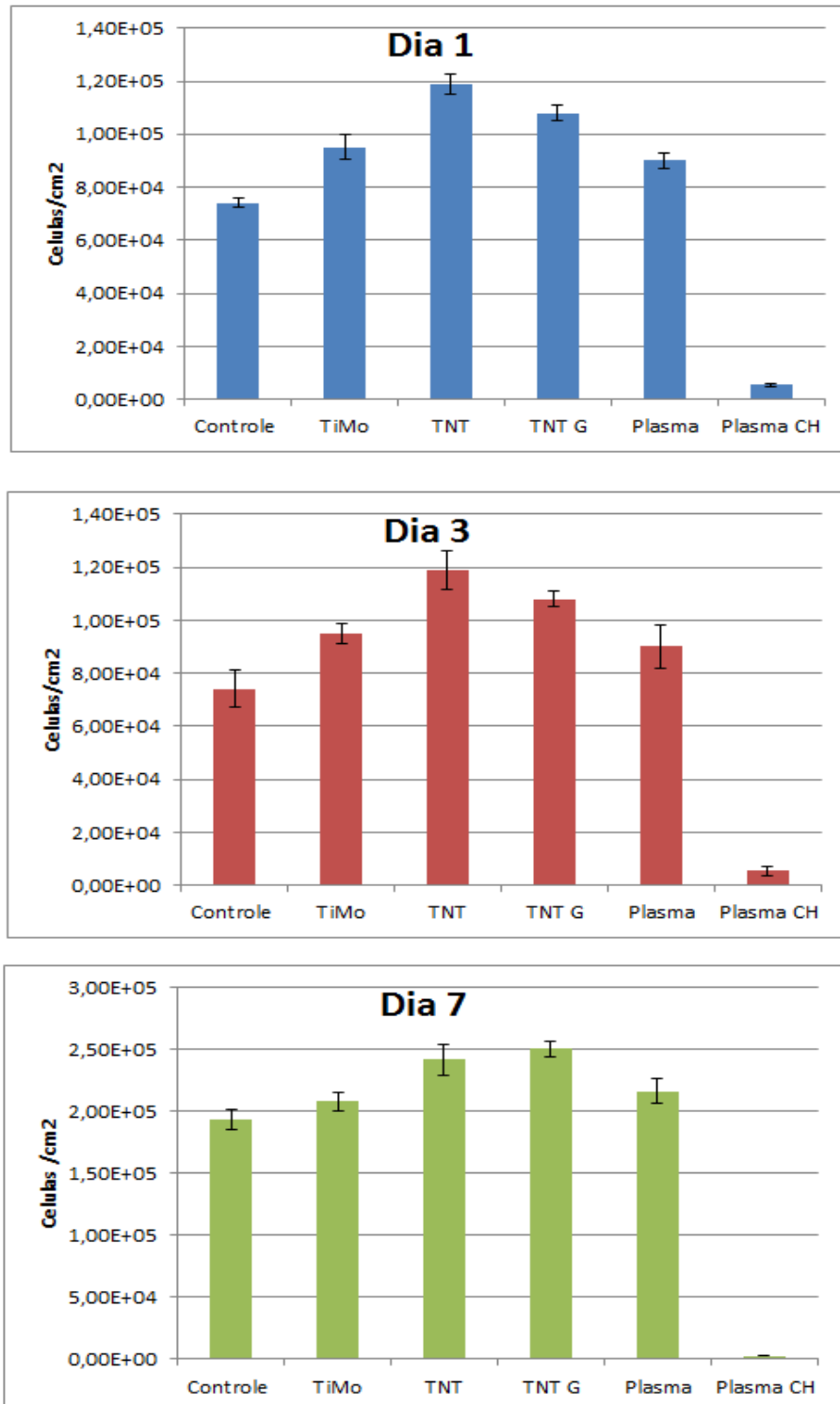
(fonte: próprio autor)

Visto que a liga Ti15Mo é disponível comercialmente para aplicações médicas o valor de absorbância obtido pode ser seguramente relacionado a um material não citotóxico, logo esse valor foi usado como base de comparação para as demais condições estudadas. A análise de variância ($p=0,01$) não mostra diferença significativa entre os grupos sem medicamentos e a liga Ti15Mo, o que nos permite inferir que nem o crescimento de nanotubos nem as diferentes técnicas de recobrimento das superfícies resultam em citotoxicidade. Por outro lado, foi possível verificar que a dose de clorexidina incorporada nas superfícies imersas no medicamento foi excessiva reduzindo drasticamente a atividade mitocondrial. O efeito citotóxico da clorexidina foi reportado em estudos precedentes em diferentes tipos de células para concentrações superiores a 0,01% (m/v) a partir de 3 horas (CHANG, 2001; GIANELLI, 2008, SEGURA, 1999).

4.3.3 Proliferação celular

A proliferação celular na superfície das amostras foi avaliada por contagem de células após 1, 3 e 7 dias de cultura. Os resultados estão expostos na Figura 50.

Figura 50 - Gráfico de crescimento celular de osteoblastos MC3T3-E1 SC4 em diferentes superfícies.



(fonte: próprio autor)

Confirmando o resultado obtido no teste de MTT a partir do primeiro dia de cultura foi possível verificar que o número de células aderidas nas amostras com clorexidina incorporada na superfície é inferior aos outros grupos, confirmando a citotoxicidade do tratamento. Conseqüentemente o baixo número de células permanece nas contagens dos dias 3 e 7 enquanto todos os outros grupos apresentaram proliferação em concordância com o comportamento esperado pela curva de crescimento realizada.

A exceção do grupo com medicamento a análise de variâncias ($p=0,05$) para os 3 tempos de contagem diferentes permitiram as seguintes considerações:

- Após 1 dia de cultura não há diferença significativa entre o número de células/cm² na superfície das amostras estudadas, ainda que somente os grupos TNT e TNT G sejam significativamente superiores ao grupo controle;
- Mais uma vez somente os grupos TNT e TNT G podem ser considerados significativamente superiores aos outros grupos estudados para o 3 dia de cultura;
- Ao final de 7 dias de cultura celular, ainda que não haja diferença significativa entre os grupos TNT e TNT G somente o segundo pode ser considerado estatisticamente superior aos demais tratamentos.

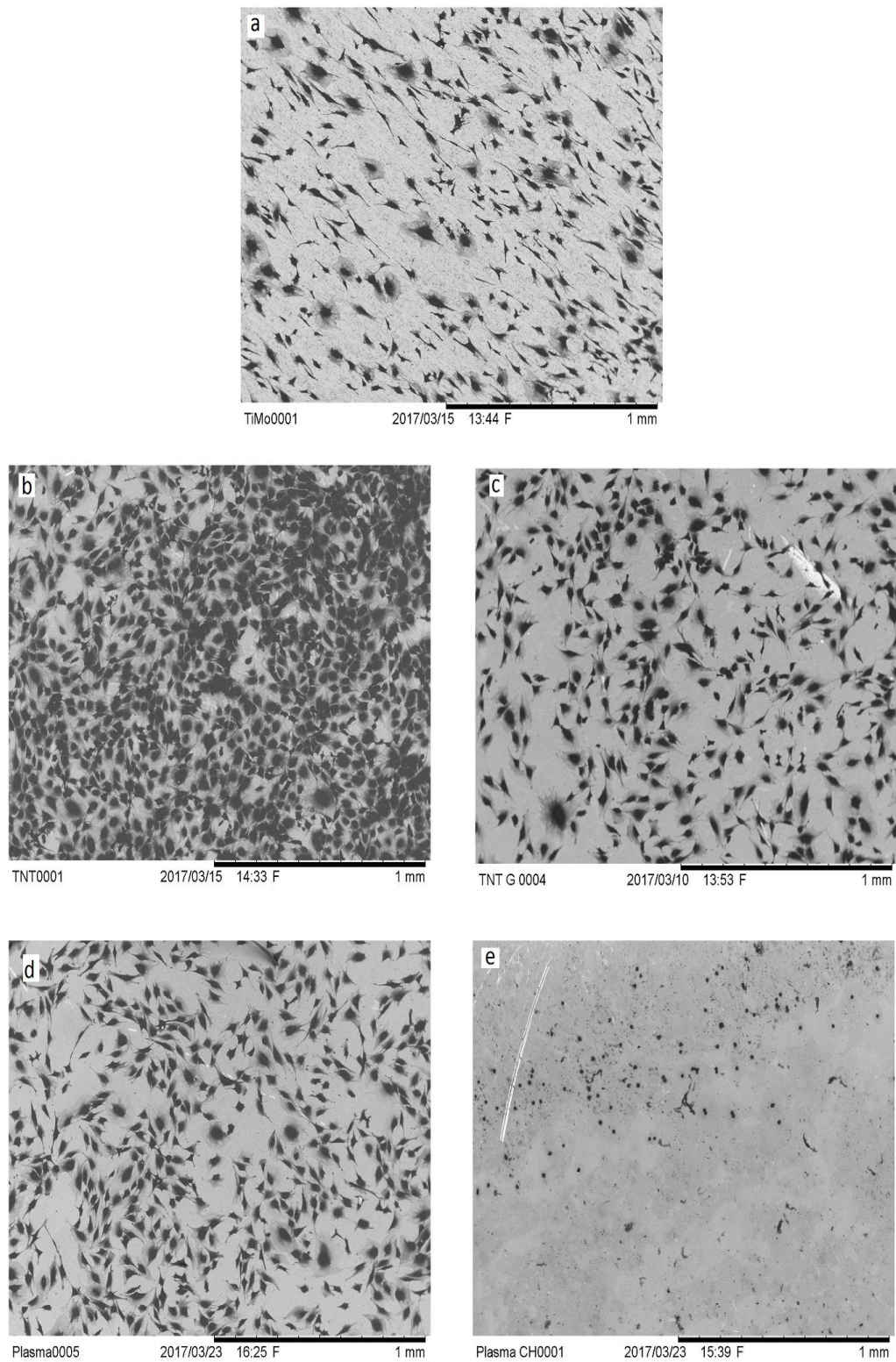
A proliferação superior da linhagem MC3T3-E1 em superfícies nanoestruturadas em comparação com suas analogas polidas já havia sido reportada por diferentes autores para amostras de titânio puro (POPAT 2007) e confirma a hipótese de que a combinação de estrutura favorável ao ancoramento e redução de ângulo de contato criada pelo crescimento de nanotubos tem efeito favorável em culturas *in vitro*. Em contrapartida a superioridade das superfícies grafíticas tem como explicação a química de superfície, em especial a presença de grupamentos SO_3^- , o qual cria condições para a ligação entre as células e a superfície em presença de proteínas, como reportado por Felgueiras et al. (2015).

4.3.4 Morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das células foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura em todas as superfícies estudadas.

A partir do terceiro dia de cultura o número de células na superfícies da maioria das amostras é tão elevado que as imagens não apresentam mais nenhuma conclusão relevante, entretanto a observação das imagens do primeiro dia de cultura permite destacar alguns pontos importantes sobre a influência da superfície sobre o crescimento celular. A Figura 51 mostra o aspecto e a distribuição das células nas superfícies avaliadas.

Figura 51 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura após 1 dia de crescimento de osteoblastos MC3T3-E1 sobre A) Ti15Mo, B) TNT, C) TNT G, D) PMOXA, E) PMOXA + CH. A superioridade dos grupos sem medicamentos é notável tanto no número quanto na forma das células.



(fonte: próprio autor)

Além de confirmar a distribuição aleatória e homogênea das células sobre as superfícies sem medicamentos (Figura 51a a 51d) as imagens confirmam os resultados da proliferação celular por contagem de células. Dois pontos importantes devem ser destacados:

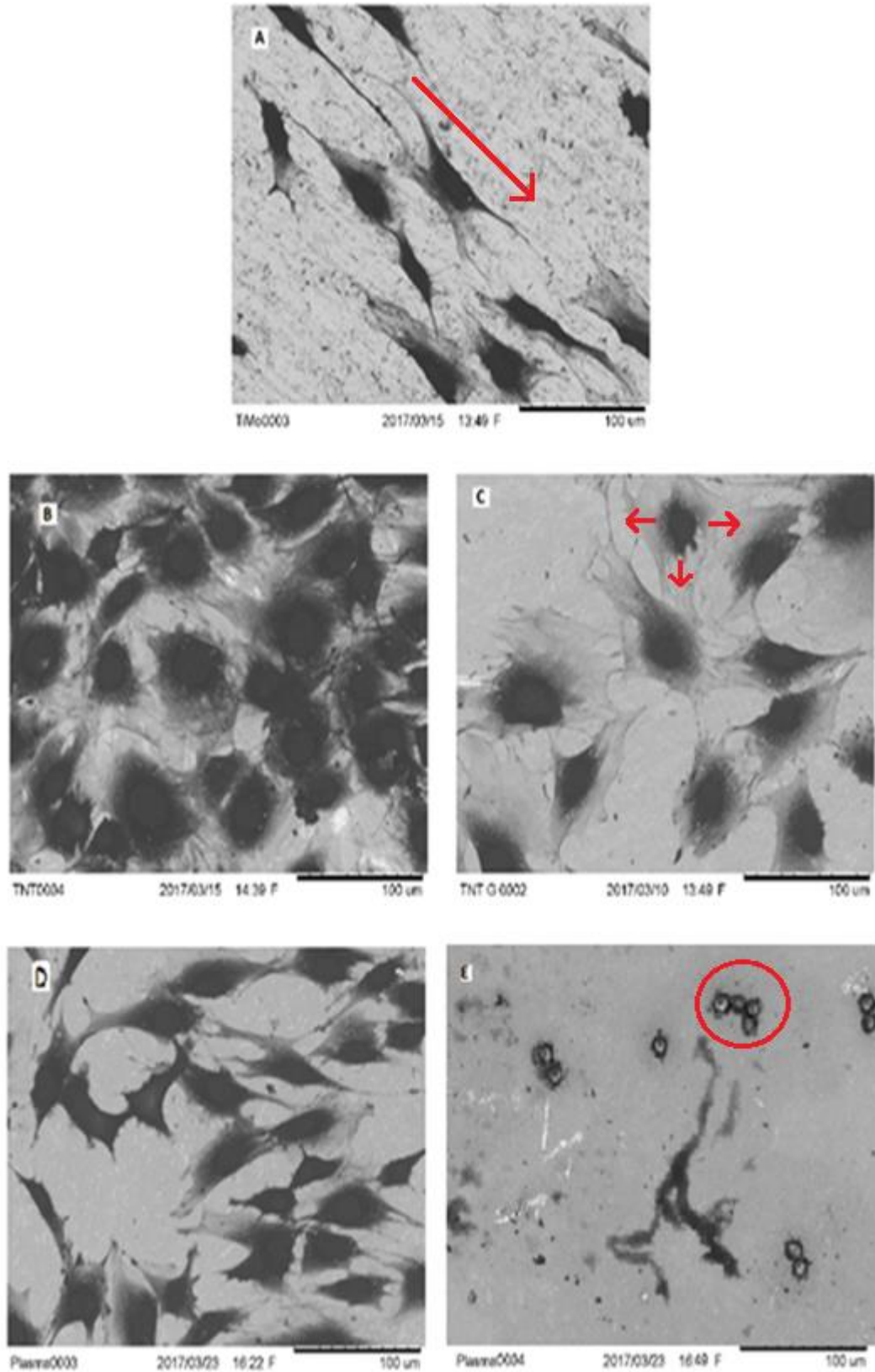
- A morte das células sobre as superfícies que sofreram a incorporação de clorexidina, evidenciada pelo tamanho reduzido e pela forma circular das células sobre tais superfícies (Figura 51e);
- A paridade dos demais grupos no que concerne ao número de células na superfície, ainda que a concentração seja ligeiramente mais importante no grupo TNT.

Imagens com maior ampliação (Figura 52) permitem uma análise mais atenta das amostras e mostram que, mesmo que o número absoluto de células não seja significativamente discrepante, a forma dos osteoblastos sofre influência da superfície na qual está aderida.

Assim como observado por Das et al. (2009) as células sobre superfícies não anodizadas (Figura 52a) possuem forma alongada e achatada em comparação com o formato mais poligonal encontrado nas superfícies com nanotubos (Figura 52b). A principal causa dessa diferença é o volume citoplasmático, que no caso da superfície de Ti15Mo é reduzida e tende a crescer nos sulcos criados pelo lixamento, diferente do que acontece para superfícies com TNT onde o citoplasma se distribui radialmente formando uma confluência de células. Além da maior rugosidade das superfícies anodizadas, contribui para tal comportamento a maior área superficial e a tendência dos filipodes a crescerem direção ao interior dos nanotubos (OH, 2006).

Para os grupos recobertos com polímeros (Figura 52c e 52d), analisando o grupo PMOXA nota-se a manutenção da forma poligonal com redução do volume da matriz extracelular, o que pode ser atribuído a mudanças na molhabilidade como visto anteriormente e permite teorizar que o recobrimento foi responsável pela diminuição do diâmetro dos nanotubos. O caso do recobrimento por NaSS apresenta-se diferentemente, pois o volume da matriz extracelular é visivelmente superior. Tal aumento da superfície celular foi reportado na literatura (FELGUEIRAS, 2017) e deve-se a facilidade de ligação entre NaSS e proteínas celulares. No que diz respeito ao grupo com incorporação de medicamentos a Figura 52e comprova a morte das células.

Figura 52 - Em detalhes morfologia das células após 1 dia cultura sobre A) Ti15Mo, B) TNT, C) TNTG, D) PMOXA e E) PMOXA + CH. Destaca-se o crescimento no sentido das ranhuras em amostras polidas em contraste com o crescimento radial sobre amostras grafitizadas. O círculo destaca o núcleo das células mortas.

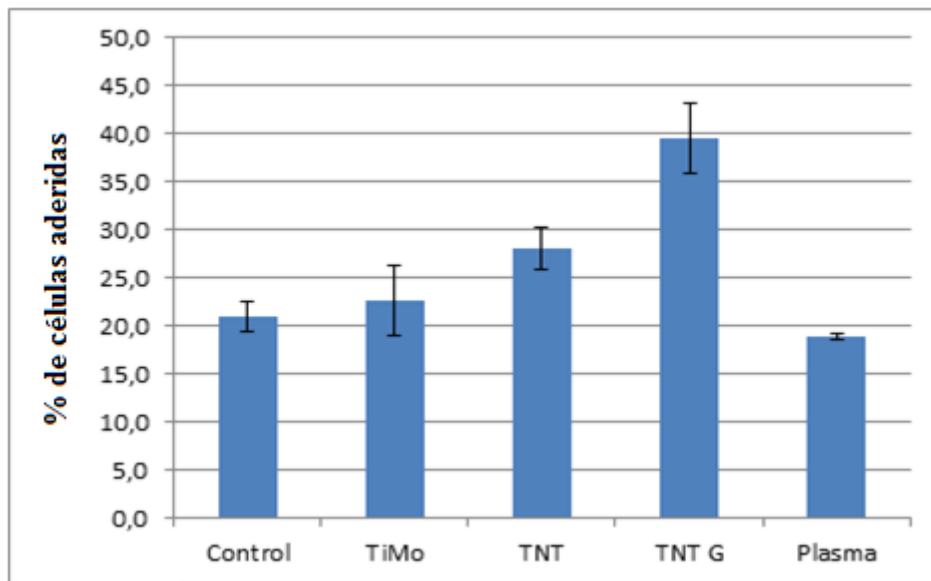


(fonte: próprio autor)

4.3.5 Adesão celular a curto período e Intensidade de Adesão a curto período

Em razão dos resultados obtidos nos ensaios anteriores somente os grupos sem incorporação de medicamento foram submetidos aos ensaios de interação célula/superfície a curto termo, começando pela adesão celular a curto período. A Figura 53 indica a porcentagem de células aderidas após 15 minutos de incorporação.

Figura 53 - Porcentagem de células MC3T3-E1 aderidas sobre diferentes superfícies após 15 minutos de incubação.



(fonte: próprio autor)

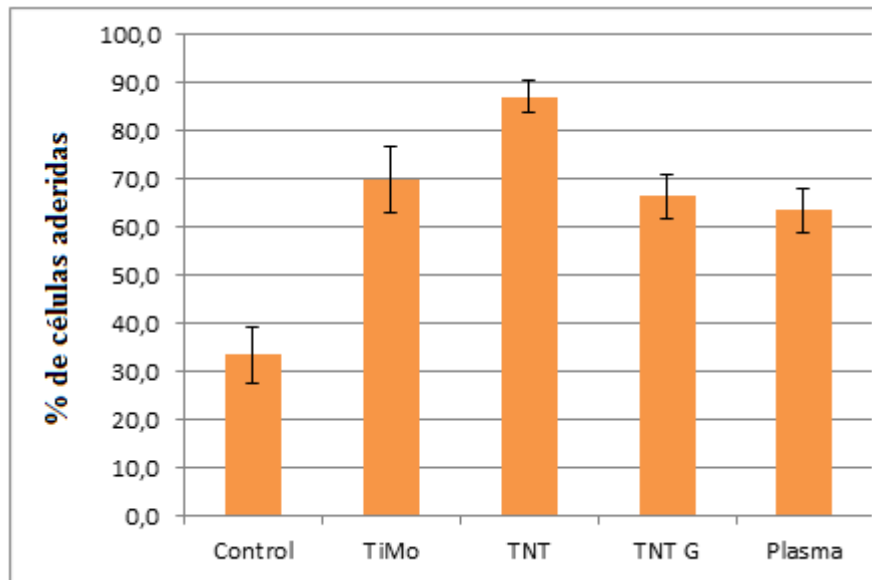
Os resultados mostram que após 15 minutos entre 20 e 40% das células já estão aderidas sobre as superfícies. Análises de variância ($\alpha = 0.05$) permitem dizer que não existe diferença significativa entre os grupos controle, Ti15Mo lixado e PMOXA, todos abaixo de 25% de aderência. O único grupo a atingir 40% de aderência e considerado estatisticamente superior a todos os demais foi o TNT grafitizado por NaSS. A melhora de adesão em superfícies ricas em grupos sulfonatos já foi reportado por Kowalczyńska et al. 2003 em fibroblastos e em adição dos resultados das demais condições permitem inferir que a adesão a curto termo é dirigida sobretudo pela química da superfície.

A rápida interação e consequente adesão de células é primordial para o sucesso da superfície na osseointegração, uma vez que *in vivo* as células ósseas competirão com outras células pela superfície do implante, em especial com células do tecido conjuntivo as quais uma vez instaladas criarão um tecido fibroso impedindo a adesão de células ósseas e posterior osseointegração (OH 2006).

Continuando o estudo da interação inicial entre os osteoblastos e as superfícies estudadas as amostras foram submetidas a esforço cisalhante por 15 minutos afim de avaliar

o quão forte foi a adesão das células. Na Figura 54 pode-se verificar a porcentagem de células que continuam aderidas após aplicação de 10 dyn/cm².

Figura 54 - Porcentagem de células aderidas após aplicação de 10 dyn/cm² por 15 minutos sobre diferentes superfícies.



(fonte: próprio autor)

A exceção do grupo controle, todas as superfícies estudadas apresentam porcentagens de adesão médias superiores a 60% valores relativamente altos considerando que as células interagiram com as superfícies por somente 15 minutos antes da aplicação do esforço. Por outro lado, dentre as superfícies estudadas somente o grupo TNT pode ser considerado estatisticamente superior aos demais ($\alpha = 0.05$), o que pode indicar que, ao contrário do que foi verificado na porcentagem de adesão inicial, este parâmetro é regido sobretudo pela morfologia em detrimento da química de superfície e contribui ainda mais para a confirmação da teoria de ancoramento dos filopodes no interior dos nanotubos.

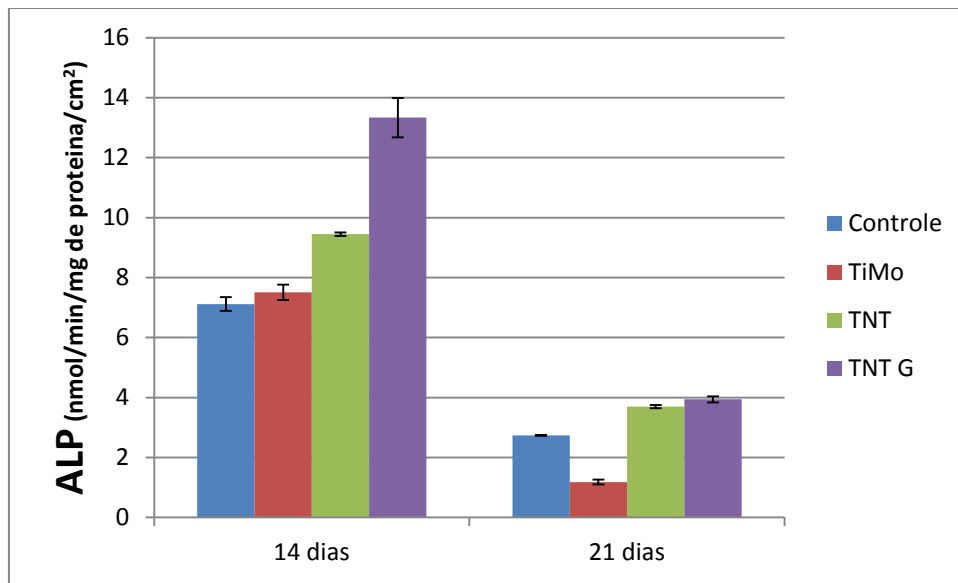
4.3.6 Diferenciação

Após avaliação dos resultados precedentes a combinação de melhor proliferação ao final de 7 dias, morfologia celular promissora e rápida adesão de osteoblastos fez com que o grupo revestido com PoliNaSS fosse escolhido para realização de ensaios de diferenciação. Foram usados como controle fundo de poços de placas 24 poços além de amostras de Ti15Mo polidas e anodizadas como fator de comparação.

4.3.6.1 Fosfatase Alcalina

A atividade da enzima fosfatase alcalina atua como indicador primário de diferenciação *in vitro* e foi avaliada após 14 e 21 dias de cultura. Os resultados são expostos na Figura 55.

Figura 55 - Absorbância de p-nitrofenol pela ação da enzima ALP sobre as diferentes superfícies estudadas.



(fonte: próprio autor)

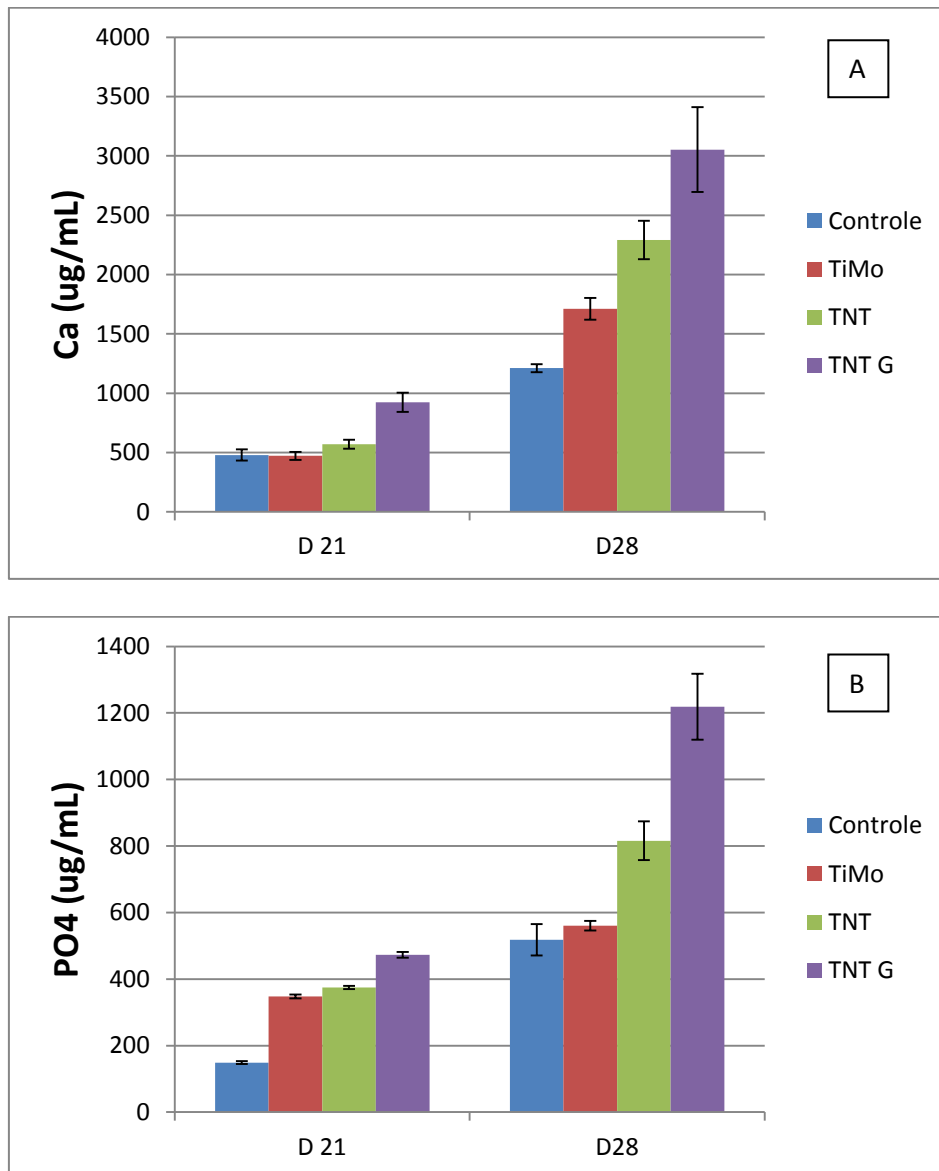
A atividade da enzima fosfatase alcalina mostrou-se estatisticamente maior em amostras anodizadas do que em amostras da liga Ti15Mo lixadas bem como o grupo controle após 14 e 21 dias de cultura. Tal resultado confirma a tendência encontrada em diversos trabalhos de que a diferenciação osteoblástica é favorecida por superfícies anodizadas (DAS 2008, POPAT 2007, YAO 2007). A atividade enzimática após 14 dias é também significativamente maior em superfícies grafitizadas que em qualquer outro grupo estudado, mais uma vez este aumento tem sido documentado na literatura (ALCHEIK 2013, HELARY 2008) confirmando a influência do NaSS na ligação entre superfícies tratadas e proteínas celulares, em especial o colágeno, um dos formadores da matriz extracelular proeminente durante a diferenciação celular.

No que diz respeito à queda dos valores, para 21 dias de incubação isso pode ser interpretada como amadurecimento da matriz extracelular (FELGUEIRAS 2013, OUGHLIS 2012) e avanço no processo de diferenciação, uma vez que a atividade de ALP é diminuída em detrimento da deposição de cálcio e fosfato em uma segunda fase de diferenciação.

4.3.6.2 Mineralização

Em uma segunda etapa do processo de diferenciação celular pode ser verificado a deposição de cálcio e fósforo indicando a maturação dos osteoblastos e mineralização da matriz extracelular. Assim como para a atividade de fosfatase alcalina foram avaliadas superfícies contendo nanotubos de TiO_2 , revestidas ou não por poliNaSS em comparação com Ti15Mo polido e grupo controle (fundo de poço). As medições foram realizadas após 21 e 28 dias de cultura e os resultados estão expostos nas Figuras 56a e 56b.

Figura 56 – Produção de A) cálcio e B) fósforo por osteoblastos após 3 e 4 semanas de incubação sobre diferentes superfícies.



(fonte: próprio autor)

Como era esperado, visto os resultados de ALP, as superfícies recobertas por poliNaSS indicam mineralização estatisticamente superior aos demais grupos para ambos os marcadores. A diferença é ainda mais proeminente após 28 dias, indicando grande maturação dos osteoblastos. Resultados semelhantes foram reportados na literatura (ALCHEIKH, 2013; FELGUEIRAS, 2017; HELARY, 2009; MAYINGI,2008) e podem mais uma vez ser atribuídos a influência dos grupos SO_3^- sobre a adsorção de proteínas da matriz extracelular na superfícies grafitizadas.

5 CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi a modificação da superfície da liga Ti15Mo por oxidação anódica e sua associação a polímeros bioativos para aplicação biomédica. Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

a) A oxidação anódica permite o crescimento de nanotubos de TiO_2 sobre liga Ti15Mo em eletrólito de NH_4F /glicerol sob potencial de anodização de 5V, 10V e 20V.

b) Nanotubos formados a 10V são compostos de óxido na fase anatase, apresentam ultra-hidrofilicidade, homogeneidade da camada e baixo diâmetro interno. A combinação dessas características é favorável ao crescimento celular e fez com que tal condição fosse escolhida para o recobrimento por polímeros e posteriores estudos *in vitro*.

c) A deposição de PMOXA pelo método físico (PECVD) pode ser realizada sob diferentes condições de potencia e todas apresentam interação positiva com o antisséptico clorexidina, porém por apresentar molhabilidade e espessura favoráveis deposições a 15W foram escolhidas para a sequência do trabalho.

d) O TiO_2 formador dos nanotubos pode ser efetivamente grafitizado com poliNaSS sem necessidade de oxidação química requerida para superfícies não anodizadas. Comparando os resultados obtidos para a taxa de grafitização das superfícies com nanotubos com as taxas reportadas na literatura para superfícies não anodizadas é possível afirmar que a nanoestruturação do óxido levou a maior grafitização da superfície.

e) As superfícies da liga Ti15Mo, anodizadas ou não, antes ou depois de recobrimento polimérico não indicam citotoxicidade. Todavia, superfícies contendo clorexidina foram responsáveis por morte celular. Estudos mais aprofundados serão necessários para confirmar se a citotoxicidade desta condição está ligada a dose de medicamento ou cinética de liberação.

f) Dentre todas as condições estudadas os nanotubos de TiO_2 revestidos de poliNaSS apresentam melhor comportamento *in vitro* no que diz respeito a viabilidade celular a 24 horas, proliferação celular a 7 dias, morfologia celular e adesão a curto termo.

g) A atividade da enzima fosfatase alcalina e deposições de cálcio e fosfato confirmam a diferenciação de osteoblasto superior em superfícies contendo poliNaSS.

Finalmente, a liga Ti15Mo contendo nanotubos e recoberta por polímeros ativos é viável para aplicações biomédicas podendo futuramente representar uma alternativa superior aos produtos disponíveis no mercado.

REFERÊNCIAS

- AINSLIE, K. M. et al.. In vitro inflammatory response of nanostructured titania, silicon oxide, and polycaprolactone. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 91, n. 3, p. 647–655, 2009.
- AISSA, I. BEN; HELARY, G.; MIGONNEY, V. Le greffage radicalaire de polymères bioactifs sur le titane pour prévenir l'infection sur prothèse articulaire. **Irbm**, v. 32, n. 5, p. 322–325, 2011.
- ALLAM, N. K.; FENG, X. J.; GRIMES, C. A. Self-Assembled Fabrication of Vertically Oriented Ta₂O₅ Nanotube Arrays, and Membranes Thereof, by One-Step Tantalum Anodization. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 20, p. 6477-6481, 2008.
- ALCHEIKH, A. et al.. PolyNaSS grafting on titanium surfaces enhances osteoblast differentiation and inhibits Staphylococcus aureus adhesion. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 24: 1745–1754, 2013
- ALTANKOV, G. et al.. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. **Journal of Biomedical Materials Research**, Vol. 30, 385391 (1996).
- AMBRICO, M. et al.. Engineering polydopamine films with tailored behaviour for next-generation eumelanin -related hybrid devices . **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 5, p. 1018–1028, 2013.
- ANAGNOSTOU, F. et al.. Osteoblast functions on functionalized PMMA-based polymers exhibiting Staphylococcus aureus adhesion inhibition. **Biomaterials**, v. 27, n. 21, p. 3912–3919, 2006.
- AW, M. S. et al.. a) Polymeric micelles in porous and nanotubular implants as a new system for extended delivery of poorly soluble drugs. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 20, p. 7082, 2011 .
- AW, M. S.; ADDAI-MENSAH, J.; LOSIC, D. Magnetic-responsive delivery of drug-carriers using titania nanotube arrays. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 14, p. 6561, 2012.
- BALLA, V. K. et al.. Direct laser processing of a tantalum coating on titanium for bone replacement structures. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 6, p. 2329-2334, 2010. ISSN 1742-7061.
- BARBOUR, M. et al.. Differential adhesion of Streptococcus gordonii to anatase and rutile titanium dioxide surfaces with and without functionalization with chlorhexidine. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. Volume 90A, Issue 4, 2008.

- BAUER, S. et al.. Size-effects in TiO_2 nanotubes: Diameter dependent anatase/rutile stabilization. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 6, p. 538–541, 2011.
- BERGMAN, C. P., STUMPF, A. Biomaterials. In: **Dental Ceramics, microstructure, properties and degradation**. 84p, VII, 2013.
- BUSER, D. et al.. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **Journal of biomedical materials research**, v. 25, n. 7, p. 889–902, 1991.
- CAPELLATO, P, et al. Fibroblast functionality on novel Ti-30Ta nanotube array. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems, Materials Science and Engineering C** 32, 2060, 2012.
- CAVALLARO, A., MACGREGOR-RAMIASA, M., VASILEV, K. Antibiofouling Properties of Plasma-Deposited Oxazoline-Based Thin Films. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, 8 (10), pp 6354–6362, 2016.
- CHAVES, J. M. et al.. Characterization of the structure, thermal stability and wettability of the TiO_2 nanotubes growth on the Ti-7.5Mo alloy surface. **Applied Surface Science**, v. 370, p. 76–82, 2016.
- CHEN, C.-H.; YANG, M.-R.; WU, S.-K. Polymerized hexamethyldisilazane coated on equiatomic TiNi shape memory alloy using DC-pulsed plasma assisted chemical vapor deposition. **Surface and Coatings Technology**, v. 202, n. 12, p. 2709–2714, 2008.
- CHEN, Y. Y. et al.. Microstructures and properties of titanium alloys Ti-Mo for dental use. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 16, n. SUPPL., p. 2–6, 2006.
- CHEN, Q., THOUAS, G. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering R**, 87, 1–57, 2015.
- CHOURIFA, H., MIGONNEY, V., FALENTIN-DAUDRÉ C. Grafting bioactive polymers onto titanium implants by UV irradiation. **Royal Society of Chemistry Advances**, 6, 13766–13771, 2016.
- CHU, P. et al.. Plasma-surface modification of biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 36, n. 5-6, p. 143–206, 2002.
- CLOUTIER, M. et al.. On the long term antibacterial features of silver-doped diamondlike carbon coatings deposited via a hybrid plasma process. **Journal Biointerphases**, 2014, Volume 9 Issue 2.
- DAS, K., BOSE, S., BANDYOPADHYAY, A. TiO_2 nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell–materials interaction. **Journal of Biomedical Materials Research**

Part A, 90(1):225-37 2009.

DE LA ROSA, V. Poly(2-oxazoline)s as materials for biomedical applications. **J Mater Sci: Mater Med**, 25:1211–1225 2014.

EISENBARTH, E. et al.. Biocompatibility of β -stabilizing elements of titanium alloys. **Biomaterials**, v. 25, n. 26, p. 5705–5713, 2004.

ESCADA, A. L. A.; NAKAZATO, R. Z.; CLARO, A. P. R. Growth of TiO₂ nanotubes by anodization of Ti–7.5Mo in NH₄F solutions. **Nanoscience and Nanotechnology Letters**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 510-512, 2013.

ESCADA, A. L., et al.. Hman dermal fibroblast adhesion on Ti-7.5Mo after TiO₂ nanotubes growth. **Materials Science Forum**, v 889, pp195-200, 2017.

FEI, B. et al.. Coating carbon nanotubes by spontaneous oxidative polymerization of dopamine. **Carbon**, v. 46, n. 13, p. 1795–1797, 2008.

FELGUEIRAS, H., MIGONNEY, V. Original article Presence of sulfonate groups on Ti6Al4V surfaces enhances osteoblastic attachment strength at the interface. **IRBM** 34, 371–37 2013.

FELGUEIRAS, H., MIGONNEY, V. Sulfonate groups grafted on Ti6Al4V favor MC3T3-E1 cell performance in serum free medium conditions. **Materials Science and Engineering C**, 39, 196–202, 2014

FELGUEIRAS, H. P.; EVANS, M., MIGONNEY, V. Contribution of fibronectin and vitronectin to the adhesion and morphology of MC3T3-E1 osteoblastic cells to poly(NaSS) grafted Ti6Al4V. **Acta Biomaterialia**, v. 28, p. 225-233, 2015.

FELGUEIRAS, H. et al.. Bone tissue response induced by bioactive polymer functionalized Ti6Al4V surfaces: In vitro and in vivo study. **Journal of Colloid and Interface Science** 491, 44–54, 2017.

GEETHA, M. et al.. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397–425, 2009.

GIANELLI, M. et al.. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. **Toxicol In Vitro**. Mar;22(2):308-17, 2008.

GULATI, K. et al.. Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 449–456, 2012.

GULATI, K.; AW, M. S.; LOSIC, D. Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection. **Nanoscale research letters**, v. 6, n. 1, p. 571, 2011.

GULATI, K.; AW, M. S.; LOSIC, D. Nanoengineered drug-releasing Ti wires as an

alternative for local delivery of chemotherapeutics in the brain. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. November, p. 2069–2076, 2012.

HANAWA, T. In vivo metallic biomaterials and surface modification. **Materials Science and Engineering A**, v. 267, n. 2, p. 260–266, 1999.

HAYAKAWA, T.; YOSHINARI, M.; NEMOTO, K. Characterization and protein-adsorption behavior of deposited organic thin film onto titanium by plasma polymerization with hexamethyldisiloxane. **Biomaterials**, v. 25, n. 1, p. 119–127, 2004.

HO, W. F.; JU, C. P.; LIN, J. H. C. Structure and properties of cast binary Ti - Mo alloys. **Biomaterials**, v. 20, n. May, p. 2115–2122, 1999.

IMBERT-LAURENCEAU, E. et al.. Surface modification of polystyrene particles for specific antibody adsorption. **Polymer**, v. 46, n. 4 SPEC. ISS., p. 1277–1285, 2005.

JIA, Z. et al.. Additively Manufactured Macroporous Titanium with Silver-Releasing Micro-/Nanoporous Surface for Multipurpose Infection Control and Bone Repair – A Proof of Concept. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, 8 (42), pp 28495–28510, 2016a.

JIA, Z. et al.. Bioinspired anchoring AgNPs onto micro-nanoporous TiO orthopedic coatings: Trap-killing of bacteria, surface-regulated osteoblast functions and host responses. **Biomaterials**. Jan;75:203-22, 2016 b.

KOWALCZYŃSKA, H., NOWAK-WYRZYKOWSKA, M. Modulation of adhesion, spreading and cytoskeleton organization of 3T3 fibroblasts by sulfonic groups present on polymer surfaces. **Cell biology international**. Volume 27, Issue 2, 101–114 2003.

KOWALSKI, D., KIM, D. AND SCHMUKI, P. TiO₂ Nanotubes, Nanochannels and Mesosponge: Self-Organized Formation and Applications. **Nano Today**, 8, 235-264, 2013.

KENER, S. et al.. Bone tissue response to titanium implant surfaces modified with carboxylate and sulfonate groups. **J Mater Sci: Mater Med**. 21:707–715, 2010.

KHUDHAIR, D. et al.. Anodization parameters influencing the morphology and electrical properties of TiO₂ nanotubes for living cell interfacing and investigations. **Materials Science and Engineering C**, 59 (2016) 1125–1142.

KULKARNI, M. et al.. Titanium nanostructures for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 26, p. 62002 (1–18), 2015.

LAI, M. et al.. Surface Functionalization of TiO₂ Nanotubes with Bone Morphogenetic Protein 2 and Its Synergistic Effect on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1097–1105, 2011.

LANGER, R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 2, p. 94–101, 2000.

- LANGER, R. S.; PEPPAS, N. A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 2, n. 4, p. 201–214, 1981.
- LARSSON, C. et al.. Bone response to surface modified titanium implants: Studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. **Biomaterials**, v. 17, n. 6, p. 605–616, 1996.
- LAVENUS, S. et al.. Cell interaction with nanopatterned surface of implants. **Nanomedicine**, vol.5, no.6, 2010.
- LE GUÉHENNEC, L. et al.. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, v. 23, n. 7, p. 844–854, 2007.
- LEONHARDT, A.; DAHLEN, G. Effect of titanium on selected oral bacterial species in vitro. **European journal of oral sciences**, v. 103, n. 6, p. 382–7, 1995.
- LI, G. et al.. Effect of calcination temperature on the morphology and surface properties of TiO₂ nanotube arrays. **Applied Surface Science**, v.255, n. 16, p.7323-7328, 2009.
- LIU, Y.; DE GROOT, K.; HUNZIKER, E. B. Osteoinductive implants: The mise-en-scène for drug-bearing biomimetic coatings. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 398–406, 2004.
- 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**, v. 47, n. 3-4, p. 49-121, 2004.
- LOCKMAN, Z., SREEKANTAN, S., ISMAIL, S., MENDE, L.S., MACMANUS-DRISCOLL, J.L. Influence of anodisation voltage on the dimension of titania nanotubes. **Journal of Alloys and Compounds**,v.503, p.359–364, 2010.
- LONG, M.; RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective. **Biomaterials**, v. 19, n. 18, p. 1621–1639, 1998.
- LUO, H. et al.. Facile synthesis of novel size-controlled antibacterial hybrid spheres using silver nanoparticles loaded with poly-dopamine spheres. **RSC Adv.**, v. 5, n. 18, p. 13470–13477, 2015.
- MAHAPATRO, A. Bio-functional nano-coatings on metallic biomaterials. **Materials Science and Engineering C**, v. 55, p. 227–251, 2015.
- MAYINGI, J. et al.. Synthèse et greffage de polymères bioactifs sur des surfaces en titane pour favoriser l'ostéointégration Grafting of bioactive polymers onto titanium surfaces and human osteoblasts response. **ITBM-RBM** 29, 1–6, 2008.
- MIYAZAKI, T. et al.. Enhancement of bonding strength by graded structure at interface between apatite layer and bioactive tantalum metal. **Journal of Materials Science: Materials**

in **Medicine**, v. 13, n. 7, p. 651-655, 2002. ISSN 0957-4530.

MIGONNEY, V. et al.. Controlled cell Adhesion and aCtivity onto TA16V titanium alloy by grafting of the SURFace: Elaboration of orthopaedic implants capable of preventing joint prosthesis infection. **Irbm**, v. 34, n. 2, p. 180–185, 2013.

MINAGAR, S. et al.. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys - A review. **J Biomed Mater Res Part A**, 101A:2726–2739, 2013.

NEUPANE, M. P. et al. Synthesis and Morphology of TiO₂ Nanotubes by Anodic Oxidation Using Surfactant Based Fluorinated Electrolyte. **Journal of Electrochemical Society**. 158(8): C242-C245; 2011.

NIINOMI, M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. **Materials Science and Engineering: A**, v. 243, n. 1-2, p. 231–236, 1998.

OH, S.H., JIN, S. Titanium oxide nanotubes with controlled morphology for enhanced bone growth. **Materials Science and Engineering C**, v.26, p.1301 – 1306, 2006.

OUGHLLIS, S. et al.. Development of proteomic tools to study protein adsorption on a biomaterial, titanium grafted with poly(sodium styrene sulfonate). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 31, p. 3681–3687, 2011.

PILLAY, V. et al.. A Review of Polymeric Refabrication Techniques to Modify Polymer Properties for Biomedical and Drug Delivery Applications. **AAPS PharmSciTech**, Vol. 14, No. 2, 2013

PONSONNET, L. et al.. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. **Materials Science and Engineering C**, v. 23, n. 4, p. 551–560, 2003.

POPAT, K. C. et al.. Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. **Biomaterials**, v. 28, n. 32, p. 4880–4888, 2007a.

POPAT, K. C. et al.. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. **Biomaterials**, v. 28, n. 21, p. 3188–3197, 2007b.

RACK, H. J.; QAZI, J. I. Titanium alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 26, n. 8, p. 1269–1277, 2006.

RANGEL, A. L. R.; MOREIRA SANTOS, G. R.; ALVES CLARO, A. P. R. Nanotubes Growth on Ti-15Mo Alloys by Anodization at Low Voltage. **Materials Science Forum**. Vol. 869, pp. 924-929, 2016.

- REGONINI, D., JAROENWORALUCK, A., STEVENS, R., BOWEN, C.R. Effect of heat treatment on the properties and structure of TiO₂ nanotubes: phase compositions. **Surface and Interface Analysis**, v.42, pp.139-144, 2010.
- RIEDEL, N.; WILLIAMS, J.; POPAT, K. Ion beam etching titanium for enhanced osteoblast response. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 18, p. 6087-6095, 2011.
- SAIDIN, S. et al.. Polydopamine as an intermediate layer for silver and hydroxyapatite immobilisation on metallic biomaterials surface. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 8, p. 4715–4724, 2013.
- SIMOVIC, S.; LOSIC, D.; VASILEV, K. Controlled drug release from porous materials by plasma polymer deposition. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 46, n. 8, p. 1317–9, 2010.
- SMITH, B. S. et al.. Hemocompatibility of titania nanotube arrays. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95A, n. 2, p. 350-360, 2010.
- SMITH, B. S. et al.. Dermal fibroblast and epidermal keratinocyte functionality on titania nanotube arrays. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2686-2696, 2011. ISSN 1742-7061.
- SOBIESZCZYK, S. Surface modification of Ti and its alloys. **Advances in Materials Science**, v.10, n.1, p.29-42, 2010.
- SONG, Y. et al.. Amphiphilic TiO Nanotube Arrays : An Actively Controllable Drug Delivery System Amphiphilic TiO₂ Nanotube Arrays : An Actively Controllable Drug Delivery. p. 4230–4232, 2009.
- STIGTER, M. et al.. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 127–137, 2004.
- SUBASH, C., MANDAL, M., Current Status and Future Prospects of New Drug Delivery System. **Pharma Times** - Vol 42 - No. 04 - 2010
- SUN, C. YING; CHE, Y. JUN; LU, S. JIN. Preparation and application of collagen scaffold-encapsulated silver nanoparticles and bone morphogenetic protein 2 for enhancing the repair of infected bone. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 2, p. 467–473, 2014.
- TAVEIRA LV, MACAK JM, TSUCHIYA H, DICK LFP, SCHMUKI P. Initiation and Growth of Self-Organized TiO₂ Nanotubes Anódically Formed in NH₄F(NH₄)₂SO₄ Electrolytes. **Journal of Electrochemical Society** v.152, n.10 p.B405-B410, 2005.
- UCHIDA, M. et al.. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Volume 64A, Issue 1, pages 164–170, 1 January 2003.

- VARGHESE, O. K. et al.. Crystallization and high-temperature structural stability of titanium oxide nanotube arrays. **Journal of Materials Research**, v. 18, n. 01, p. 156–165, 2003.
- VASCONCELOS, D. et al.. Role of protein environment and bioactive polymer grafting in the S. epidermidis response to titanium alloy for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, 45, 176–183, 2014.
- VASILEV, K. et al.. Tailoring the surface functionalities of titania nanotube arrays. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 532–540, 2010.
- WANG, R. R.; LI, Y. In vitro evaluation of biocompatibility of experimental titanium alloys for dental restorations. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 80, n. 4, p. 495–500, 1998.
- WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. **Elsevier Science Limited**, 1987.
- WILLIAMS, D. F. **The Williams dictionary of biomaterials**. Liverpool University Press Liverpool, United Kingdom. 1999.
- WU, C. et al.. Applied Surface Science Polydopamine-mediated surface functionalization of electrospun nanofibrous membranes: Preparation, characterization and their adsorption properties towards heavy metal ions. **Applied Surface Science**, v. 346, p. 207–215, 2015.
- YANG, M.-R.; WU, S. . DC plasma-polymerized hexamethyldisilazane coatings of an equiatomic TiNi shape memory alloy. **Surface and Coatings Technology**, v. 127, n. 2-3, p. 273–280, 2000.
- YAO, C.; SLAMOVICH, E. B.; WEBSTER, T. J. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 85, n. 1, p. 157–166, 2008.
- YOSHINARI, M. et al.. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. **Biomaterials**, v. 22, n. 14, p. 2043–2048, 2001.
- YU, F. et al.. Experimental and theoretical analysis of polymerization reaction process on the polydopamine membranes and its corrosion protection properties for 304 Stainless Steel. **Journal of Molecular Structure**, v. 982, n. 1-3, p. 152–161, 2010.
- YU, J., WANG, B. Effect of calcination temperature on morphology and photoelectrochemical properties of anodized titanium dioxide nanotube arrays. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 94, p. 295-302, 2010.
- ZANINI, S. et al.. Plasma polymerized 2-ethyl-2-oxazoline: Chemical characterization and study of the reactivity towards different chemical groups. **Materials and Design**, 108 791–800, 2016.
- ZHAO, L. et al.. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver

nanoparticles. **Biomaterials** 32 (2011) 5706-5716.

ZHAO, L. et al.. The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2055–2063, 2010.

ZORN, G. et al.. Characterization of Poly(sodium styrene sulfonate) Thin Films Grafted from Functionalized Titanium Surfaces. **American Chemical Society**. *Langmuir*, 27, 13104–13112, 2011.