

REGINALDO TOSHIHIRO KONATU

**FUNCIONALIZAÇÃO DA LIGA $Ti_{15}Zr_{15}Mo$ APÓS CRESCIMENTO DE
NANOTUBOS DE TiO_2 COM RECOBRIMENTO DE QUITOSANA, ÁCIDO
HIALURÔNICO E PARTÍCULAS DE ZnO PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Guaratinguetá - SP
2018

Reginaldo Toshihiro Konatu

Funcionalização da liga Ti15Zr15Mo após crescimento de nanotubos de TiO₂ com recobrimento de quitosana, ácido hialurônico e partículas de ZnO para aplicação biomédica

Qualificação apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica na área de materiais.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Paula Rosifini Alve Claro
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo França
Coorientador: Dra. Ana Lúcia do Amaral Escada

Guaratinguetá - SP
2018

K82f

Konatu, Reginaldo Toshihiro

Funcionalização da liga Ti5Zr15Mo após crescimento de nanotubos de TiO2 com recobrimento de quitosana, ácido hialurônico e partículas de ZnO para aplicações biomédicas / Reginaldo Toshihiro Konatu – Guaratinguetá, 2018

117 f. : il.

Bibliografia: f. 104-113

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2018.

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

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo França

1. Materiais biomédicos. 2. Nanotubos. 3. Quitosana. I. Título.

CDU 620.1(043)



Luciana Máximo

Bibliotecária-CRB-8/3595

REGINALDO TOSHIHIRO KONATU

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. GILBERT SILVA
UNIFEI


Prof. Dr. PAULO CÉSAR SOARES JÚNIOR
PUC/PR


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

Março de 2017

DADOS CURRICULARES

REGINALDO TOSHIHIRO KONATU

NASCIMENTO	20.03.1986 – São Paulo / SP
FILIAÇÃO	Tomio Konatu Amélia Hatsuco Konatu
2006/2012	Graduação em Engenharia de Materiais Universidade estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita filho’
2012/2014	Pós-graduação - Mestrado em engenharia mecânica Universidade estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita filho’.

dedico este trabalho
de modo especial, à minha família

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, fonte da vida e da graça. Agradeço pela minha vida, minha inteligência, minha família e meus amigos,

ao meu orientador, *Prof. Dr. Ana Paula Rosifini Alves Claro* que jamais deixou de me incentivar. Sem a sua orientação, dedicação e auxílio, o estudo aqui apresentado seria praticamente impossível.

aos meus pais *Tomio e Amélia*, que apesar das dificuldades enfrentadas, sempre incentivaram meus estudos.

ao Professor Dr. Rodrigo França por me receber pelo programa da PDSE da capes e pela coorientação em Winnipeg.

ao Professor Dr. Diego Mantovani por me receber pelo programa ELAP do governo canadense durante 6 meses na Universidade de Laval em Quebec.

ao Professor Dr. Ketul Popat e professora Dra. Claudia Vianna Maurer Morelli e Dra. Marisa Beppu pela ajuda e cooperação nas análises.

aos funcionários da Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá pela dedicação e alegria no atendimento.

às funcionárias da Biblioteca do Campus de Guaratinguetá pela dedicação, presteza e principalmente pela vontade de ajudar,

aos colegas de pós-graduação e em especial Taise Azevedo de Sousa, João Pedro Carobolante, Felipe Vicente de Paula Kodaira e Pedro Willians de Paiva Filho.

aos colegas que me ajudaram durante esse período Rogerio Aparecido Bataglioli, João Batista Maia Rocha Neto e Lucas de Paula Ramos.

Agradecemos ao LME-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”
Mahatma Gandhi

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de revestimentos poliméricos bactericidas formados por ácido hialurônico/quitosana/ZnO na superfície da liga Ti15Zr15Mo após crescimento de nanotubos de TiO₂ empregando oxidação anódica. A liga Ti15Zr15Mo foi processada em forno a arco voltaico com atmosfera controlada e tratados termicamente. Os nanotubos de TiO₂ foram obtidos por meio de oxidação anódica. Para obtenção dos revestimentos, as amostras foram recobertas com camadas de ácido hialurônico/quitosana/ZnO. As superfícies foram avaliadas empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise por difração de raios-X (DRX), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) e ângulo de contato. A condição ideal para obtenção dos nanotubos ordenados de TiO₂ na superfície da liga foi 30V, eletrólito formado por glicerol, água deionizada (1:1 em volume) e fluoreto de amônio (2,7 g/L) e tempo de 24 horas. Para esses parâmetros, os nanotubos formados apresentaram diâmetro médio de 130 nm e espessura de 1290 nm. O revestimento polimérico escolhido foi de 2 bicamadas de ácido hialurônico/quitosana contendo partículas de ZnO. Os estudos *in vitro* realizados para avaliar adesão bacteriana de *Staphylococcus aureus* mostraram que não houve diferença significativa entre as amostras com e sem recobrimento.

PALAVRAS-CHAVE: Biomateriais. Funcionalização. Quitosana. Nanopartículas de ZnO. Ligas de titânio.

ABSTRACT

Nowadays the development of new materials for biomedical application has become of extreme importance due to the need of new materials with excellent mechanical properties, physicochemical and biocompatibility for use in the manufacture of biomedical devices. In addition to the material presenting the necessary bulk properties, it is of utmost importance that they present a response from the host to the implant. For this, the surface of the material must have characteristics that can be obtained with superficial treatments. This work aims at the analysis of the surface of nanotubes grown on the Ti15Zr15Mo alloy functionalized with thin film of hyaluronic acid, chitosan and ZnO nanoparticles. The surface was analyzed by scanning electron microscopy (SEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and contact angle. The nanotubes formed had a mean diameter of 130 nm and a thickness of 1290 nm. The coating with the polymeric bilayers, with a number of more than 4 bilayers, closed the nanotubes and increased the contact angle, being used 2 bilayers for the incorporation of ZnO. The concentration of the ZnO solution was very low for incorporation and bactericidal effect.

KEYWORDS: Biomaterials. Functionalization. Chitosan. ZnO nanoparticles. Titanium alloys.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de aplicações de materiais para área biomédica.	15
Figura 2 - Estrutura HCP (fase Alfa) e CCC (Fase Beta). [colocar as estruturas na imagem] 22	
Figura 3 - Influência dos elementos de liga em diagrama de fase genéricos para ligas de titânio.	23
Figura 4 - Diagrama de fase do sistema binário Ti-Zr.	25
Figura 5 - Valores do módulo de elasticidade do osso e algumas ligas de titânio.	26
Figura 6 - Diagrama de fase do sistema binário Ti-Mo.	28
Figura 7 - Esquema representativo dos diferentes níveis de estruturas presente no implante e no tecido	30
Figura 8 - Mecanismo de formação dos nanotubos de TiO ₂	31
Figura 9 - Ilustração esquemática da formação dos nanotubos e a curva da densidade de corrente pelo tempo de anodização.	32
Figura 10 - Estrutura das fases anatase e rutilo do óxido de titânio	36
Figura 11 - Esquema do crescimento dos cristais da fase anatase e do rutilo na estrutura dos nanotubos em função da temperatura. Esquema proposto por Yu (2010).	37
Figura 12 - estrutura molecular do monômeros a) quitosana, b) ácido hialurônico e c) polietilenoimina	39
Figura 13 - Fluxograma empregado no desenvolvimento do trabalho, dividido nas três etapas.	42
Figura 14 - Equipamento de Fusão, A) Forno de fusão, B) cadinho de cobre refrigerado à água e eletrodo de tungstênio, C) Material para fusão	44
Figura 15 - Equipamento para anodização, constituído por uma fonte corrente continua, um eletrodo auxiliar de platina e o eletrodo de trabalho contendo a amostras da liga.	47
Figura 16 - Fluxograma do processo de recobrimento <i>layer-by-layer</i>	48
Figura 17 - Equipamento de recobrimento layer by layer com as soluções para o recobrimento polimérico de PEI	49
Figura 18 - Recobrimento <i>layer-by-layer</i> de HA e CHI	50
Figura 19 - Esquema da formação das bicamadas sobre as amostras	50
Figura 20 - Fluxograma da incorporação de nanopartículas de ZnO	51

Figura 21 - Equipamento de recobrimento <i>layer-by-layer</i> com as soluções de HA, CHI, ZnO e as soluções de lavagem posicionados na sequência de utilização, que será no sentido anti-horário.....	52
Figura 22 - Esquema da deposição de filmes finos sobre a superfície de nanotubos de TiO ₂ .	52
Figura 23 - Porta amostra preparado com as amostras para análise no XPS.....	54
Figura 24 - Amostras preparadas para viabilidade bacteriana.....	55
Figura 25 - a) Micrografia da superfície da liga Ti15Zr15Mo obtida após fusão em forno a arco voltaico, tratamento térmico de homogeneização (1000 °C), forjamento a quente e solubilização (900 °C e 2 h); b) Difratoograma da liga Ti15Zr15Mo para as mesmas condições.	58
Figura 26 - Micrografia da superfície anodizada da liga Ti15Zr15Mo (MEV) após oxidação anódica a 20 V durante 06 h. Vista de topo e lateral (detalhe).....	60
Figura 27 - Micrografia da superfície anodizada da liga Ti15Zr15Mo (MEV) após oxidação anódica a 20 V durante 24 h. Vista de topo e lateral (detalhe).....	61
Figura 28 - Micrografia da superfície anodizada da liga Ti15Zr15Mo (MEV) após oxidação anódica a 30 V, (a) 6 h e (b) 24 h. Vista de topo e lateral (detalhe).....	62
Figura 29 - (a) Microscopia da superfície de nanotubos de TiO ₂ crescidos sobre a liga Ti15Zr15Mo, utilizando 30 V, durante 24 h, e calcinado a 450 °C. (b) Difração de raios-X da superfície analisada.....	66
Figura 30 - Espectro de XPS das amostras lixadas.	67
Figura 31 - Espectro de alta resolução do C, O, Ti, Zr, Mo e Zn da amostra sem tratamento de superfície. A análise feita na superfície é apresentada abaixo (vermelho) enquanto a mais profunda é apresentada acima (azul).	69
Figura 32 - Espectro de varredura da superfície das amostras com nanotubos de TiO ₂	72
Figura 33 - Mev dos nanotubos de TiO ₂ crescido na superfície da liga Ti15Zr15Mo recobertos com 2 bicamadas de [HA/CHI/ZnO]. A) imagem da partícula, B) análise da composição química por EDS da partícula, identificando a intensidade de cada elemento presente na superfície dos nanotubos.	74
Figura 34 - Mev dos nanotubos de TiO ₂ crescido na superfície da liga Ti15Zr15Mo recobertos com 8 bicamadas de [HA/CHI/ZnO]. A camada apresenta um número grande de partículas poliméricas na superfície	75

Figura 35 - Espectro Survey da liga lixada funcionalizada com 2 bicamadas e solução de ZnO 1mM e detalhe da superfície analisada.	77
Figura 36 - Espectro da liga com superfície de nanotubos recobertos com duas bicamadas e solução de 1 mM de ZnO com o detalhe da superfície dos nanotubos de TiO ₂	81
Figura 37 - Espectro do XPS da amostra lixada, funcionalizada com duas bicamadas e em solução de 3 mM de ZnO.	84
Figura 38 - Espectro do XPS da amostra com nanotubos funcionalizadas com duas bicamadas e solução de 3 mM de ZnO.	87
Figura 39 - Espectro de XPS da liga lixada funcionalizada com duas bicamadas e solução de 5 mM de ZnO.	90
Figura 40 - Espectro de XPS da liga com superfície com nanotubos funcionalizados com duas bicamadas e solução de 5 mM de ZnO.	92
Figura 41 - Superfície da amostra lixada sem tratamento, com microrganismos crescido sobre sua superfície. Detalhe do microrganismo sobre amostra lixada sem tratamento.	96
Figura 42 - Superfície da amostra com superfície de nanotubos, com microrganismos crescido sobre sua superfície.	97
Figura 43 - Superfície da amostra com superfície de nanotubos e recobertos com o biopolímero e partículas de ZnO (solução de 1 mM), com microrganismos crescido sobre sua superfície.	98
Figura 44 - Superfície da amostra com nanotubos e recobertos com o biopolímero e partículas de ZnO (solução de 3 mM), com microrganismos crescido sobre sua superfície.	99
Figura 45 - Superfície da amostra com superfície de nanotubos e recobertos com o biopolímero e partículas de ZnO (solução de 5 mM), com microrganismos crescido sobre sua superfície.	10
0	
Figura 46 - Proliferação bacteriana sobre os diferentes grupos testados.	10

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μm	micrometro (unidade de medida de comprimento, equivale 10^{-6} m)
A	Ampere (unidade de corrente elétrica)
BHI	Brain Hearth Infusion
CHI	Quitosana
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DRX	Difração de raios-X
FC	Faculdade de Ciências de Bauru
FEG	Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá
HA	Ácido hialurônico
ICT	Instituto de Ciência e Tecnologia
IQ	Intituto de Química de Araraquara
LME	
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIM	Manitoba Intitute for Materials
mL	mililitro (unidade de volume)
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazoilium)
nm	nanometro (unidade de medida de comprimento, equivale 10^{-9} m)
PEI	Polietilenoimina
s	Segundo (unidade de tempo)
TiO ₂	Dióxido de titânio.
UoM	Univeristy of Manitoba – Canadá
V	Volts (unidade de tensão elétrica)
XPS	Espectrometria de fotoelétrons excitados por raios-X
ZnO	Óxido de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	OBJETIVOS.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	BIOMATERIAL	20
2.2	TITÂNIO E SUAS LIGAS.....	21
2.2.1	<i>Sistema binário Ti-Zr.....</i>	<i>24</i>
2.2.2	<i>Sistema Binário Ti-Mo</i>	<i>27</i>
2.2.3	<i>Sistema ternário Ti15Zr15Mo</i>	<i>28</i>
2.3	TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE.....	29
2.3.1	<i>Oxidação anódica.....</i>	<i>31</i>
2.3.2	<i>Eletrólito.....</i>	<i>33</i>
2.3.3	<i>Potencial.....</i>	<i>34</i>
2.3.4	<i>Tempo de anodização.....</i>	<i>35</i>
2.3.5	<i>Calcinação</i>	<i>36</i>
2.4	FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE.....	37
2.4.1	<i>Nanopartículas de óxido de zinco.....</i>	<i>39</i>
2.5	IN VITRO.....	40
2.5.1	<i>Crescimento Bacteriano.....</i>	<i>40</i>
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	PROCESSAMENTO DA LIGA	42
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA LIGA TI15ZR15MO	45
3.3	TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE.....	45
3.3.1	<i>Oxidação anódica.....</i>	<i>45</i>
3.3.2	<i>Funcionalização da superfície e incorporação de ZnO</i>	<i>47</i>
3.3.3	<i>Medida do tamanho dos nanotubos</i>	<i>53</i>
3.4	TAMANHO DE PARTÍCULAS DE ZNO.....	53
3.5	ÂNGULO DE CONTATO.....	53
3.6	ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (XPS)	54
3.7	PROLIFERAÇÃO BACTERIANA.....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57

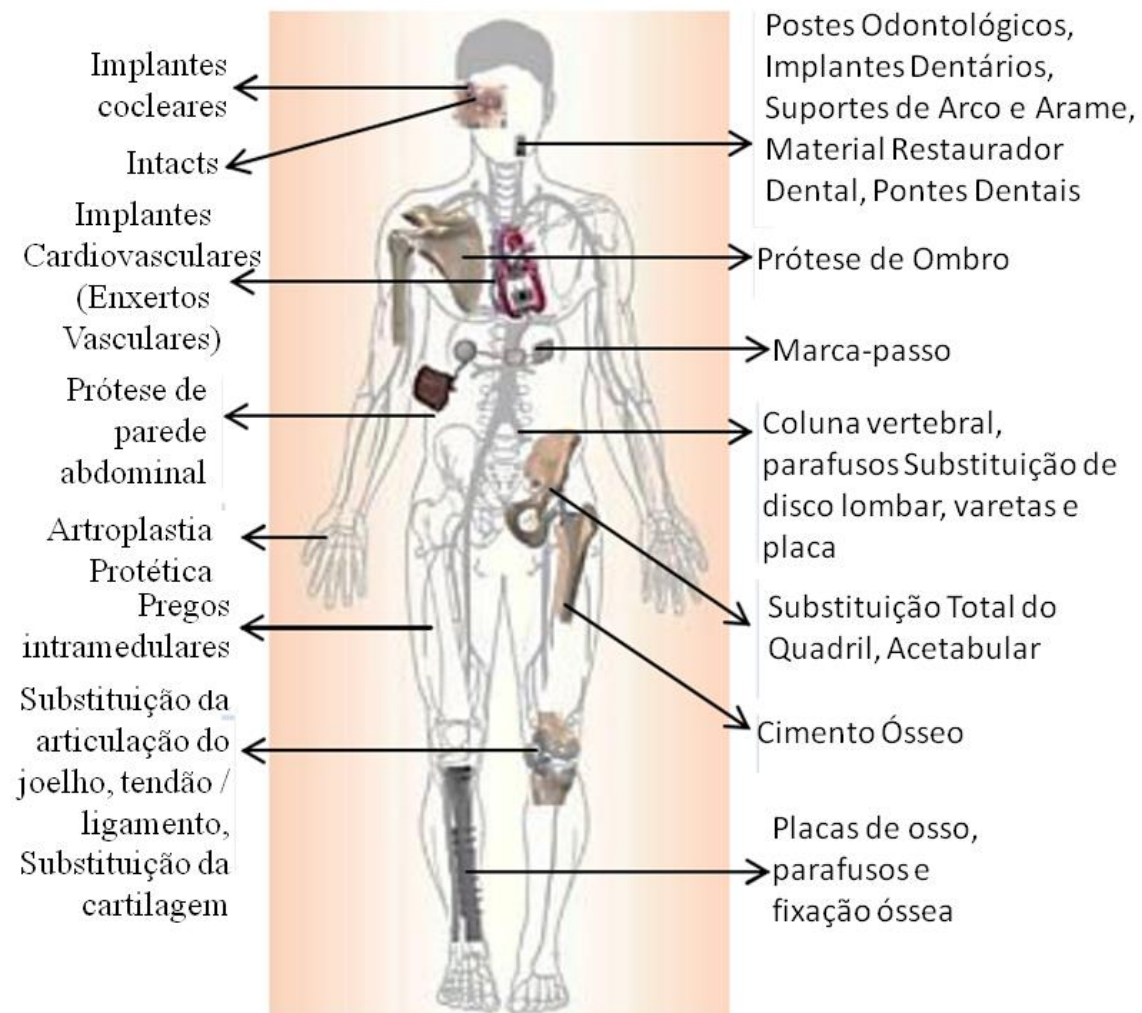
4.1	CARACTERÍSTICAS DA SUPERFÍCIE DA LIGA Ti15Zr15Mo APÓS OXIDAÇÃO ANÓDICA	57
4.1.1	<i>Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X</i>	67
4.2	FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE	73
4.2.1	<i>Ângulo de contato</i>	75
4.3	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO NA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	76
4.4	ESTUDO IN VITRO – ADESÃO BACTERIANA	95
5	CONCLUSÕES	102
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
	REFERÊNCIAS	104
	APÊNDICE	114

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos e da área médica possibilitaram o desenvolvimento de materiais capazes de substituir órgãos e tecidos afetados por doenças ou traumas. O principal objetivo da Engenharia Médica é a constante superação das limitações dos tratamentos vigentes baseados na cirurgia de reconstrução e nos transplantes de órgãos.

Diversos materiais foram pesquisados e desenvolvidos ao longo dos anos para essas aplicações, empregados, por exemplo, na confecção de marca-passos, próteses e implantes (Fig.1). Esses materiais devem possibilitar a sua aplicação de forma segura sem risco de rejeição pelo organismo (SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003).

Figura 1 - Exemplos de aplicações de materiais para área biomédica.



Fonte: Adaptado Patel e Gohil (2012)

A escolha de um material na substituição de determinada função será diretamente dependente inicialmente das suas propriedades, podendo ser químicas, físicas ou mecânicas. Para a substituição de tecidos duros, o material deverá exibir resistência mecânica, à corrosão e ao desgaste (GEETHA *et al.*, 2009). Os materiais metálicos como aço inoxidável 316L, cobalto cromo (Co-Cr) e titânio e suas ligas exibem essas propriedades, o que os tornam candidatos em potencial para essa função. As principais aplicações desses materiais podem ser observadas no Quadro 1.

Quadro 1- Materiais metálicos empregados como biomateriais e suas aplicações.

Tipo de material	Aplicações
Aço inoxidável	Substituições de articulação (quadril, joelho), placa óssea para fixação de fratura, implante dentário para fixação de dentes, válvula cardíaca, instrumentos espinhais, instrumentos cirúrgicos, parafusos, raiz dentária, placas de fratura, haste de fixação, prótese de ombro.
Ligas Co-Cr	Placa óssea para fixação da fratura, parafusos, implantes dentários, prótese dentaria ou ortopédica, mini placas, ferramentas cirúrgicas, substituições ósseas e articulares (quadril, joelho), implantes dentários
Titânio e suas ligas	Substituições ósseas e articulares (quadril, joelho), implantes dentários para fixação de dentes, parafusos, peças para cirurgia ortodôntica, dispositivos de fixação óssea como pregos, parafusos e placas, válvulas cardíacas artificiais e instrumentos cirúrgicos.

Fonte: Adaptado de Patel e Gohil, 2012

As ligas de titânio apresentam um custo mais elevado quando comparadas ao aço inoxidável e as ligas Co-Cr, no entanto, seu módulo de elasticidade reduzido e excelente biocompatibilidade resultante de sua elevada resistência à corrosão as coloca em papel de destaque. A liga Ti6Al4V faz parte da primeira geração das ligas estudadas para essas aplicações. Desenvolvidas inicialmente para aplicações aeroespaciais, a presença dos elementos alumínio e vanádio tem sido associada a doenças como mal de Alzheimer e ainda inflamações de órgãos inviabilizando sua utilização. (EISENBARTH; VELTEN, 2004) (LONG; RACK, 1998). Para contornar esse problema, novas ligas de titânio livres de elementos citotóxicos foram estudadas ao longo das últimas décadas, por exemplo, ligas dos sistemas binários e ternários, Ti-Mo (OLIVEIRA *et al.*, 2007; ESCADA *et al.*, 2013; HO *et al.*, 2008; SUKEIDAI *et al.*, 2003), TI-TA (CAPELLATO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2005; LI

et al., 2010), TI-ZR (CORREA *et al.*, 2014, VICENTE *et al.*, 2014, IKARASHI *et al.*, 2007, Ho *et al.*, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 1995), Ti-Zr-Mo (CORREA *et al.*, 2015, HO ET AL., 2012). Esses sistemas têm em comum o emprego de elementos que afetam diretamente as propriedades mecânicas destacando-se o módulo de elasticidade reduzido.

O sistema ternário Ti-Zr-Mo foi escolhido para estudo devido as suas excelentes propriedades mecânicas. A adição de zircônio ao sistema Ti-Mo propicia o aumento na dureza (HO *et al.*, 2012), enquanto a presença do molibdênio reduz o módulo de elasticidade devido a estabilização da fase β (ZHAO *et al.*, 2012). A liga Ti15Zr15Mo apresenta propriedades mecânicas, físico químicas promissoras para aplicação biomédica (CORREA *et al.*, 2015). No entanto, apesar das excelentes propriedades de volume essas ligas são bioinertes o que torna interessante o estudo de técnicas de modificação de superfície para garantir uma melhor resposta biológica quando inserida no meio.

Se as propriedades da superfície do implante não são selecionadas adequadamente, as células podem formar uma camada de tecido fibroso entre o implante o osso colocando em risco o sucesso do implante. A falta de união osso/implante leva a micromovimentação e inflamação, resultando na perda do implante. Dessa forma a manipulação das propriedades de superfície dos implantes pode evitar a falha (GITTENS *et al.*, 2014).

As técnicas para modificar a superfície do material podem ser mecânicas (usinagem, polimento), físicas (*plasma spray*, *sputtering*) ou químicas (modificações bioquímicas, deposição química a vapor, oxidação anódica)(SOBIESZCZYK; ZIELIŃSKI, 2008).

A oxidação anódica chama a atenção, mediante as outras técnicas de modificação de superfície, por exigir equipamentos e reagentes mais simples, baratos e de melhor controle da morfologia da estrutura formada. A técnica consiste em realizar um processo que envolve a oxidação da liga e a dissolução do óxido formado no meio eletrolítico que ocorre o processo. É possível a formação de diversas estruturas desde camadas porosas até nanotubos ordenados dependendo da composição do material, potencial, eletrólito, entre outros parâmetros que irão variar de acordo com a composição da liga (KOLWALSKI; KIM; SCHMUKI, 2013).

A alteração da topografia do material possibilita um criar condições que favorecem o desenvolvimento de células e microrganismos. Os tecidos apresentam uma variedade de estruturas em diferentes dimensões. O osso apresenta estruturas de macro até sub-nano estruturas (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998) e a topografia da

superfície do implante influencia a resposta das células e dos tecidos em diferentes escalas (ANSELME, 2011). Os tratamentos de superfície alteram a adesão celular, proliferação e viabilidade das células sobre as superfícies modificadas (CAPELLATO *et al.*, 2012).

Apesar das atividades bactericidas atribuídas na literatura aos nanotubos de TiO_2 a incorporação de medicamentos (HAMLEKHAN *et al.*, 2015; MOSEKE *et al.*, 2012) e associação de revestimentos bactericidas (VASCONCELOS *et al.*, 2014) a essas superfícies podem ser mais efetivas no combate a adesão e proliferação de bactérias (SIRELKHATIM *et al.*, 2015).

O emprego de nanopartículas de óxidos é uma alternativa para o uso de medicamentos conferindo ao material propriedades bactericidas. Alguns óxidos metálicos foram estudados para aplicação e dentre eles o óxido de zinco (ZnO) é uma das alternativas e que já é utilizado em medicamentos e que possui característica bactericida e não é tóxica. A eficiência das partículas está inversamente relacionada ao tamanho de partículas (PADMAVATHY, 2008) e que pode ser incorporada a filmes de quitosana e poli (vinil álcool), mantendo as características bactericidas sobre o *S. aureus* (Vicentini, 2010).

A fixação das partículas sobre a superfície de um implante é realizada por meio de uma interface que irá se aderir ao implante e fixar as partículas nesta superfície. E por meio da técnica layer-by-layer (LBL) é possível utilizar diferentes materiais, combinando suas propriedades. A combinação de quitosana e ácido hialurônico já foi utilizada como filme bactericida, por combinar as propriedades antimicrobianas da quitosana e a superfície formada pelo ácido hialurônico, além de não serem tóxicos (HERNÁNDEZ-MONTELONGO *et al.*, 2016a). Desta forma é possível construir um compósito de filme fino de multicamadas de ácido hialurônico, quitosana e partículas de ZnO intercalados. O número de multicamada é controlado pelo número de deposições realizadas sobre uma superfície.

Dessa forma o desenvolvimento de materiais com excelentes propriedades de volume e superfície tem sido alvo de diversas pesquisas na área biomédica no mundo todo.

1.1 OBJETIVOS

A partir do exposto o presente trabalho teve como objetivo principal a modificação da superfície da liga Ti15Zr15Mo empregando oxidação anódica, para o crescimento de nanotubos de TiO₂, associada ao emprego de revestimento polimérico para incorporar partículas de óxido de zinco, conferindo à superfície nano-estruturada propriedades bactericidas.

Para se atingir o objetivo principal será necessário realizar os seguintes objetivos específicos:

- Processamento da liga Ti15Zr15Mo empregando metodologia preconizada em métodos anteriores.
- Estudo dos parâmetros para o crescimento de nanotubos de TiO₂ empregando oxidação anódica na superfície da liga Ti15Zr15Mo.
- Deposição de revestimentos poliméricos PEI/ácido hialurônico/quitosana
- Incorporação de nanopartículas de zinco a esses recobrimentos a partir da variação das concentrações
- Estudos in vitro para avaliar a viabilidade do emprego da técnica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAL

Um biomaterial é definido como sendo um material natural ou artificial que é utilizado para confeccionar estruturas ou implantes. Os materiais utilizados para implantes ortopédicos necessitam de uma excelente biocompatibilidade, resistência a corrosão em ambiente corpóreo, uma combinação entre resistência à tração e baixo módulo de elasticidade, resistência à fadiga e ao desgaste, sem ser citotóxico (GEETHA, 2009). Os materiais metálicos apresentam as propriedades mais adequadas para substituição de tecido duro, como os ossos. A Tabela 1 mostra os valores do módulo de elasticidade e resistência à tração de alguns ossos do corpo humano.

Tabela 1 - Valores de propriedades mecânicas de alguns tecidos duros do homem.

Ossos	Módulo (GPa)	Resistencia a tração (Mpa)
Ossos duros		
Ossos Corticais (longitudinal)	17,7	133
Ossos corticais (transversal)	12,8	52
Ossos esponjosos	0,4	7,4
Esmalte	84,3	10
Dentina	11,0	39,3

Fonte: (PATEL; GOHIL, 2012)

Quando o tecido duro necessita ser substituído, geralmente são utilizados materiais metálicos para fabricação dos dispositivos que irá ser implantado para substituir o tecido afetado. A grande diferença entre o módulo de elasticidade do osso e do material utilizado no implante gera uma diferença de distribuição de cargas na estrutura óssea, resultando no fenômeno conhecido por *stress shielding*, que causa a reabsorção óssea, podendo levar a perda de densidade óssea resultando na perda do implante.

Outro grande problema ao introduzir peças metálicas ao corpo humano, é a liberação de íons, que podem ocorrer pela reação do material com o meio intracorpóreo ou pela ação do atrito entre componentes do implante, ocorrendo de forma independente ou simultânea. Para solucionar estes problemas, materiais com uma maior resistência a corrosão e melhor

resistência ao desgaste são necessários, e por ser um processo difícil de ser evitado, os íons liberados não podem desencadear um efeito prejudicial ao hospedeiro. (NINOMI, 2008).

Para ser atender as necessidades de um biomaterial, ele deve apresentar propriedades mecânicas adequadas, biocompatibilidade, alta resistência à corrosão e ao desgaste (GEETHA *et al.*, 2009). Dentre os materiais empregado no uso biomédico, eles podem ser divididos em materiais cerâmicos, poliméricos e metálicos.

2.2 TITÂNIO E SUAS LIGAS

O titânio e suas ligas são materiais de grande interesse na indústria aeronáutica, química e biomédica devido à relação de resistência à tração, a baixa massa específica do elemento e à elevada resistência à corrosão. A elevada resistência à corrosão é resultado da formação de uma camada densa e estável de óxido de titânio (TiO₂). Essa camada irá proteger o metal, possibilitando utilizá-lo em ambiente com condições agressivas (ambientes corrosivos). Por apresentar essas propriedades, o titânio e suas ligas demonstraram uma grande aplicabilidade na área biomédica.

O titânio é um metal de transição, apresenta massa específica de 4,507 g/cm³ e uma resistência a tração entre 760 MPa, se comparado com a do aço inoxidável 316L que apresenta densidade de 8,0 g/cm³ e resistência mecânica à tração que varia de 600 a 1300 Mpa (Tabela 2). O titânio apresenta propriedades favoráveis para a aplicação biomédica devido a menor densidade e melhor resistência à corrosão.

Tabela 2 - Materiais empregados na área biomédica comparado com o osso.

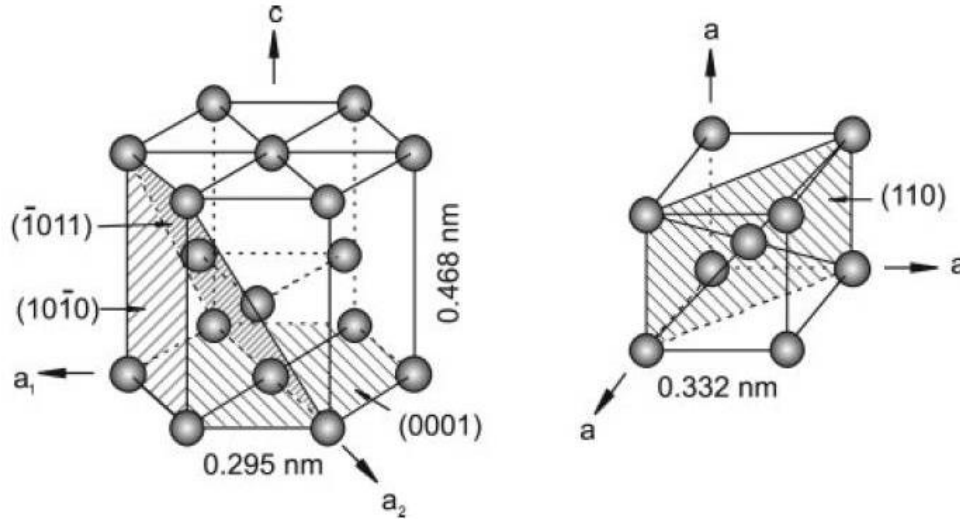
Material	Módulo de elasticidade E (GPa)	Resistência a tração (MPa)
Aço inoxidável	190	586-1,351
Co-Cr	210-253	655-1,896
Titânio	110	760
Ti6Al4V	116	965-1103
Osso Cortical	15-30	70-150

Fonte: Patel & Gohil, 2012

O titânio possui alotropia, apresentando duas estruturas cristalinas. A estrutura hexagonal compacta (HCP), também conhecida como a fase α e acima da temperatura β -*transus*, (titânio é 882 °C) o titânio passa da estrutura hexagonal compacta para a cúbica de

corpo centrado (CCC), denominada fase β (Figura 2). A temperatura *liquidus* para o titânio é a 1672 °C.

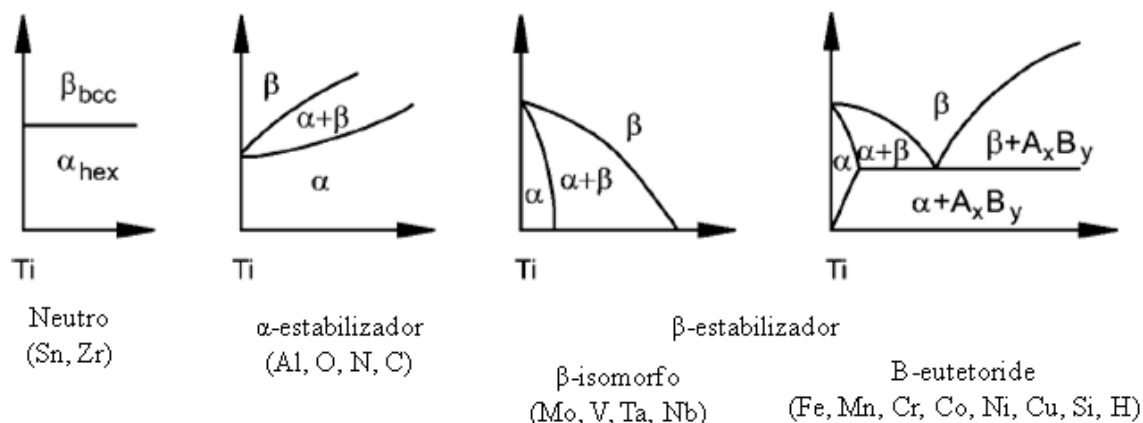
Figura 2 - Estrutura HCP (fase Alfa) e CCC (Fase Beta). [colocar as estruturas na imagem]



Fonte: (PETERS, 2003)

As ligas de titânio podem ter a temperatura β -*transus* alterada quando adicionado elementos de liga (Figura 3). Os elementos de liga podem ser divididos em grupos: os elementos neutros (Sn e Zr) são aqueles que não alteram a temperatura β -*transus*; os elementos α -estabilizadores (Al, O, N e C), são aqueles que elevam a β -*transus*, fazendo com que a fase α continue estável a uma temperatura mais elevada; os elementos β -estabilizadores diminuem a temperatura β -*transus*, estabilizando a fase β em uma temperatura menor. Os elementos de liga podem ser divididos em dois grupos: os β -eutetóides e os β -isomorfos. Os β -eutetóides (Fe, Mn, Cr, Co, Ni, Cu, Si, H) são aqueles que formam um composto intermetálico, e os β -isomorfos (Mo, V, Ta, Nb) tem uma solubilidade maior no titânio e não formam um composto intermetálico. A Figura 3 mostra a influência dos elementos de liga em diagrama de fase genéricos para ligas de titânio

Figura 3 - Influência dos elementos de liga em diagrama de fase genéricos para ligas de titânio.



Fonte: (PETERS, 2003)

O titânio comercialmente puro (TI-CP) pode ser dividido em graus de pureza, (Tabela 4) variando principalmente o teor de oxigênio presente na composição. Pela composição o Ti-CP é classificado como tipo α . As ligas de titânio são conhecidas como liga do tipo α , quando a fase predominante é a alfa (quando não apresentam ou apresentam teores de elementos β -estabilizadores até 2 % em massa). Ligas do tipo β , quando apresentam um teor capaz de estabilizar a fase β e ligas tipo $\alpha+\beta$, quando apresenta as duas fases presente e a razão entre a fase α/β apresenta-se de 5-40 % da fase β .

Tabela 3 - Composição das ligas de Ti-CP de grau 1 ao 4, contendo valores máximos dos elementos.

Grau	C [%m]	Fe [%p]	N [%p]	O [%p]	H [%p]	Ti [%p]
1	0,08	0,20	0,03	0,18	0,015	99,5
2	0,08	0,3	0,03	0,25	0,015	99,2
3	0,08	0,3	0,05	0,35	0,015	99,1
4	0,08	0,50	0,05	0,40	0,015	99,0

Fonte: ASTM B265-15

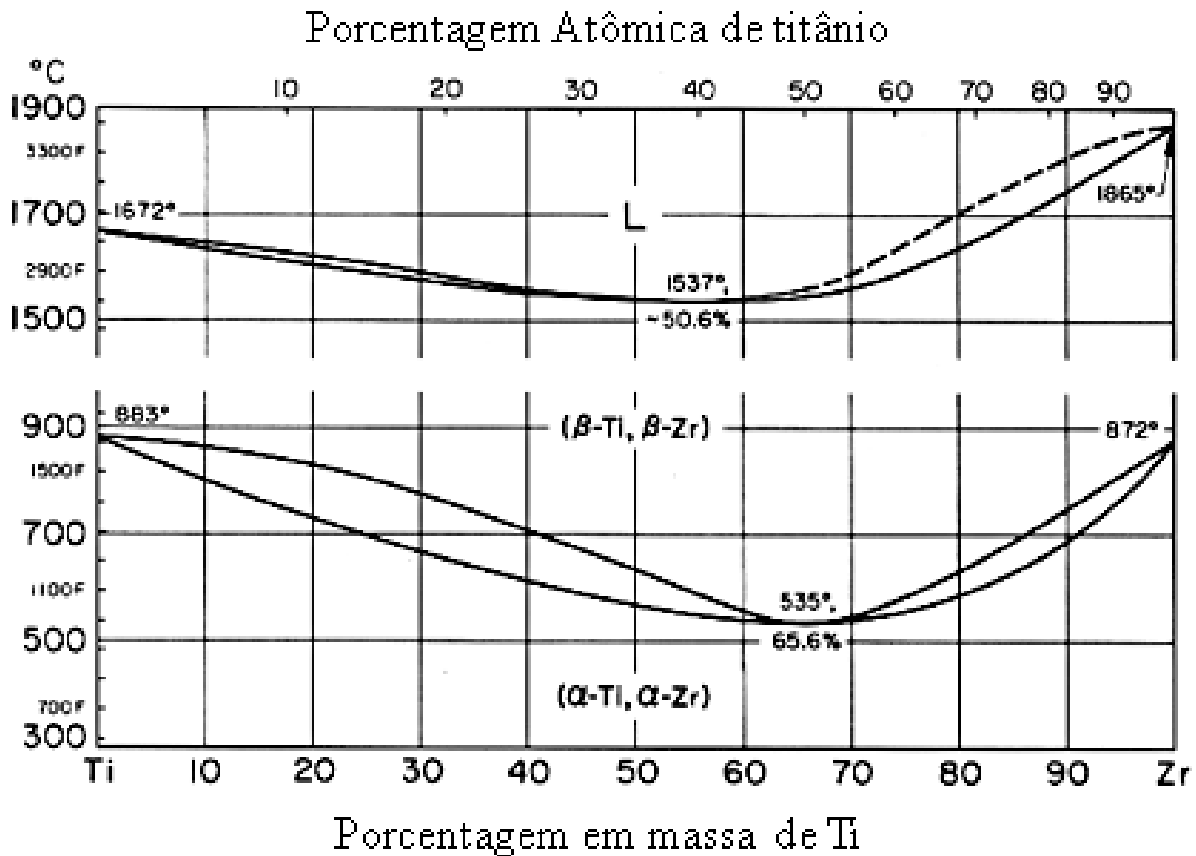
A fase α apresenta as seguintes propriedades, se comparadas com as ligas do tipo β : resistência a deformação plástica, baixa ductilidade, anisotropia mecânica, alta resistência a fluência.

Além das fases estáveis, o titânio apresenta as fases metaestáveis, que podem ser obtidas através da variação dos elementos de liga e/ou processamento da liga. A decomposição da fase β fora do estado de equilíbrio pode resultar em transformações $\beta \rightarrow \alpha'$, $\beta \rightarrow \alpha''$ ou $\beta \rightarrow \omega$. Quando as ligas de titânio são aquecidas acima da β -*transus* e resfriadas rapidamente, impedindo a movimentação atômica, ocorre a deformação da estrutura HC. Essa transformação é chamada de transformação martensítica, formando outras estruturas α' (hexagonal) e α'' (ortorrômbica), dependendo do teor dos elementos de liga (LÜTJERING; WILLIAMS, 2003). Baixos teores de β -estabilizadores resultam na fase α' , enquanto alto teores resultam em α'' resultado do cisalhamento da estrutura hexagonal, devido ao excesso de soluto na estrutura, resultando em uma estrutura ortorrômbica. (Nag, 2008; Zhou *et al.* 2009) Outra forma de obter estrutura α'' é por deformação mecânica que irá cisalhar as estruturas (Nag, 2008).

2.2.1 Sistema binário Ti-Zr

De acordo com o diagrama de fases do sistema binário Ti-Zr (Figura 4), a adição de zircônio leva a uma diminuição da temperatura β -*transus* e a temperatura de fusão da liga de 1670 °C do Ti-CP para ~1640 °C para teores de 10% de Zr e ~1560 °C para teores de 40% de Zr (Ho *et al.* 2008) sendo que a partir de teores de 65,6 % em massa ocorre uma nova elevação de temperatura.

Figura 4 - Diagrama de fase do sistema binário Ti-Zr.

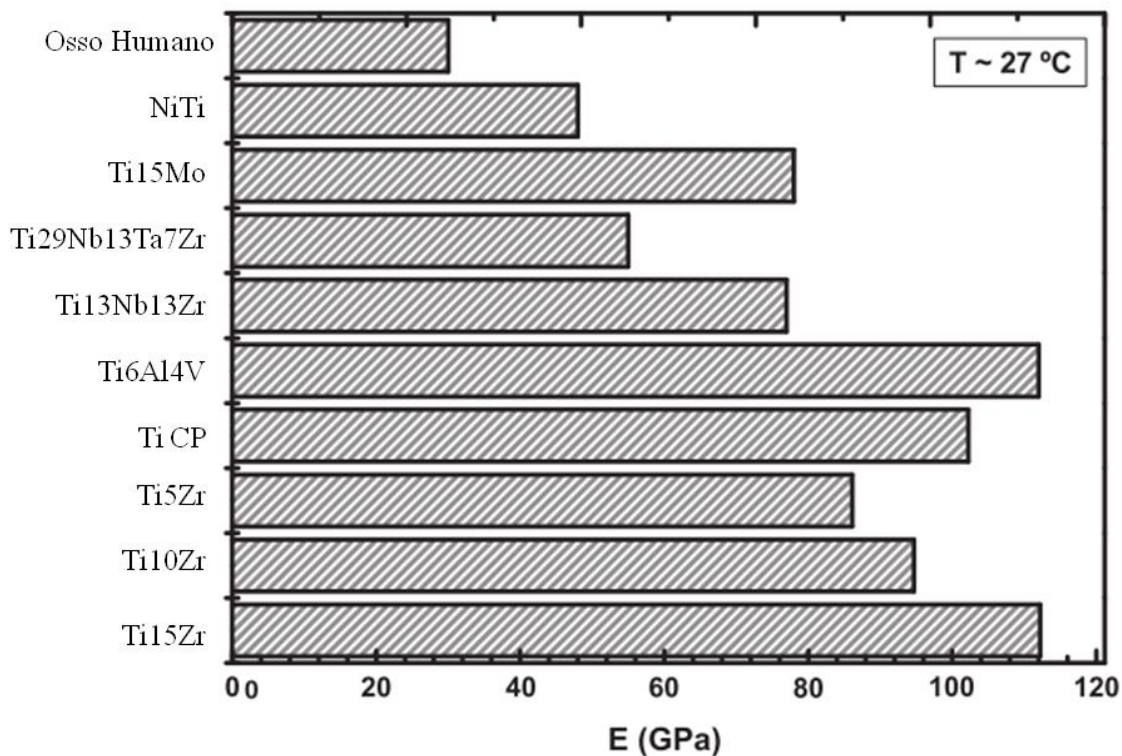


Fonte: Ho et al. (2008)

Correa *et al.* (2011) avaliaram as ligas de Ti5Zr, Ti10Zr, Ti15Zr. Os autores observaram um aumento do valor do módulo de elasticidade de acordo com a adição de zircônio, sendo obtido os valores de 88, 97 e 116 GPa respectivamente, os quais estão bem próximos ao do Ti6Al4V que é de 110 GPa (Figura 5).

Para as ligas Ti10Zr, Ti20Zr, Ti30Zr e Ti40Zr houve formação da fase α' para todos os teores avaliados (CHOE *et al.* 2011)

Figura 5 - Valores do módulo de elasticidade do osso e algumas ligas de titânio.



Fonte: Ho et al. (2008)

A adição de Zr levou a maiores valores de dureza, a adição de Zr ao titânio foi estudada por Ho *et al.* (2008), verificou-se que adição de Zr eleva a dureza da liga. O incremento da dureza do material reduz a quantidade de material liberado resultante de esforços mecânicos por atrito entre os componentes do implante, melhorando a biocompatibilidade e favorecendo a liberação de íons metálicos resultante de esforços mecânico de atrito.

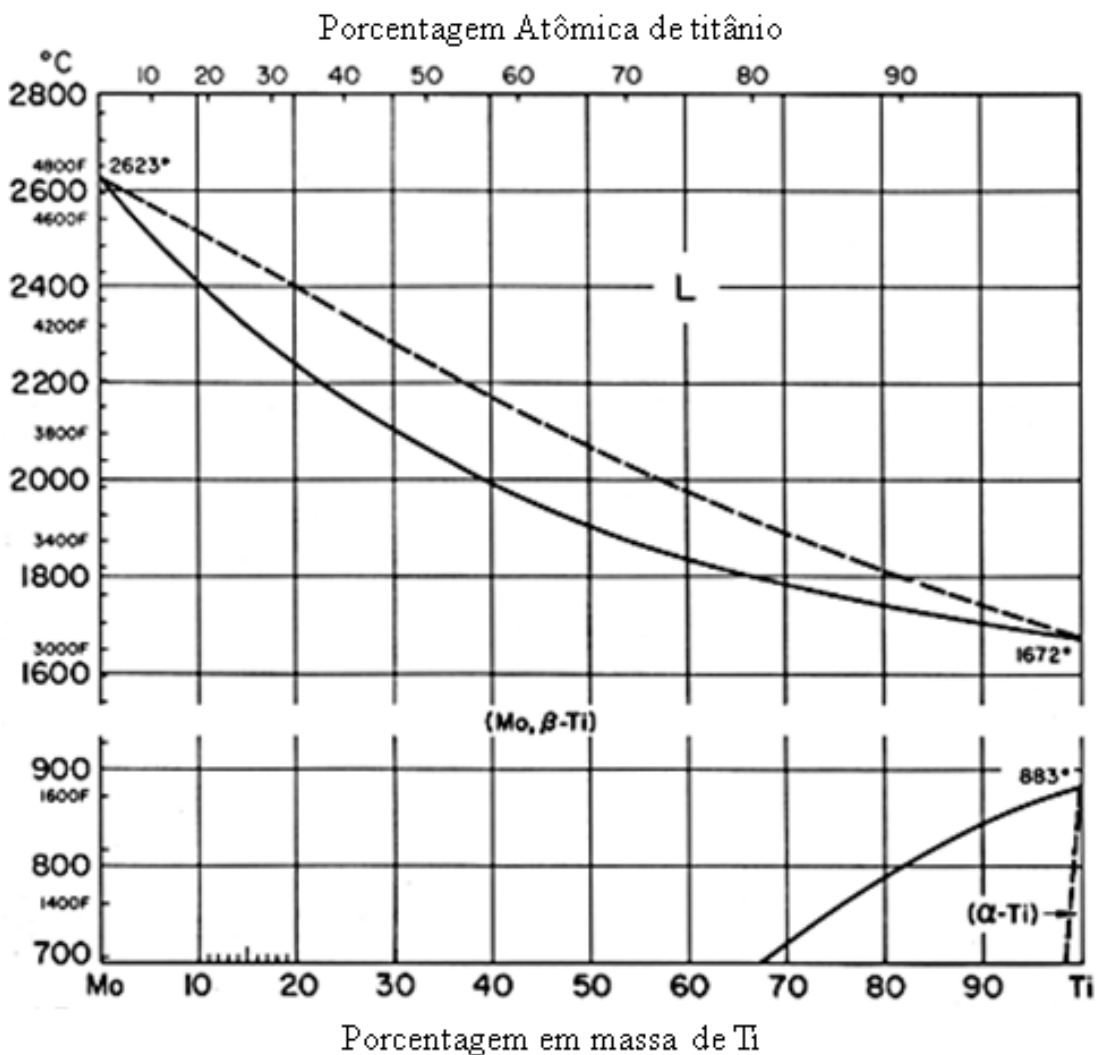
Em estudo de biocompatibilidade da liga Ti-Zr realizado por Ikarashi *et al.* (2007), comparando os implantes de Ti, Zr, Ti-Zr e Cr realizado em animais, demonstrou que os materiais em estudo não apresentaram toxicidade, não ocorrendo reação alérgica. Houve a formação de uma cápsula fibrosa envolvendo os implantes, porém as células inflamatórias ao redor desta cápsula foram menores na liga Ti-Zr em comparação ao Cr.

2.2.2 Sistema Binário Ti-Mo

Na Figura 6 pode-se observar o sistema binário Ti-Mo. O molibdênio puro apresenta ponto de fusão em 2623 °C, enquanto o titânio puro apresenta temperatura de fusão de 1672 °C. A adição de titânio ao molibdênio resulta na diminuição do ponto de fusão da liga. Quando adicionado ao titânio, o molibdênio, que é um β -estabilizador, diminui a temperatura β -*transus*. Oliveira *et al.* (2007) estudaram o sistema binário Ti-XMo (X=4-20% massa) verificando que a liga apresenta uma mistura de fases hexagonal α' e ortorrômbica α'' para concentrações próximas de 4%Mo e para concentrações acima de 6%Mo é encontrada somente fase α'' e acima de 10%Mo foi encontrada a fase β , que também foi observado por Ho *et al.* (1999) e que mostrou que a liga Ti7,5Mo e a Ti15Mo apresentam os menores módulo de elasticidade do sistema binário Ti-Mo.

Zhao *et al.* (2012) estudaram algumas concentrações da liga Ti-XMo variando o teor de molibdênio de 15 até 18 % em massa. Mostrando que a deformação a frio da liga pode gerar a fase ω , elevando o módulo de elasticidade da liga. O módulo de elasticidade encontrado para liga foi próximo de 75 GPa, mais baixo que do Ti CP e que o Ti6Al4V, mesmo assim ainda é elevado se comparado com osso que pode chegar a 30 GPa.

Figura 6 - Diagrama de fase do sistema binário Ti-Mo.



Fonte: Diagrama: Mo-Ti (2017)

2.2.3 Sistema ternário Ti15Zr15Mo

As propriedades mecânicas da liga Ti15ZrXMo (X= 5, 10, 15 e 20 %massa) foram estudadas por Correa *et al.* (2014, 2015) mostrando que a concentração de Mo influencia a fase formada, acima de 10% de Mo na liga estabiliza a fase β . A liga apresentou propriedades mecânicas promissoras para aplicação biomédica, como elevada dureza (350-400 HV) e baixo módulo de elasticidade (75 GPa) quando comparada com o Ti CP (108 GPa) e a liga Ti6Al4V (113 GPa).

Zhao *et al.* (2011) estudaram a liga Ti30ZrXMo com valores de 0-8% massa de Mo, encontrou propriedades mecânicas favoráveis para aplicação biomédica, como baixo módulo

de elasticidade, resistência a tração e alongamento máximo. A liga Ti30Zr7Mo apresentou o melhor resultado de citotoxicidade comparado com o aço inoxidável 316L.

Óxido de zircônio apresenta biocompatibilidade e citotoxicidade segundo Liu *et al.* (2006).

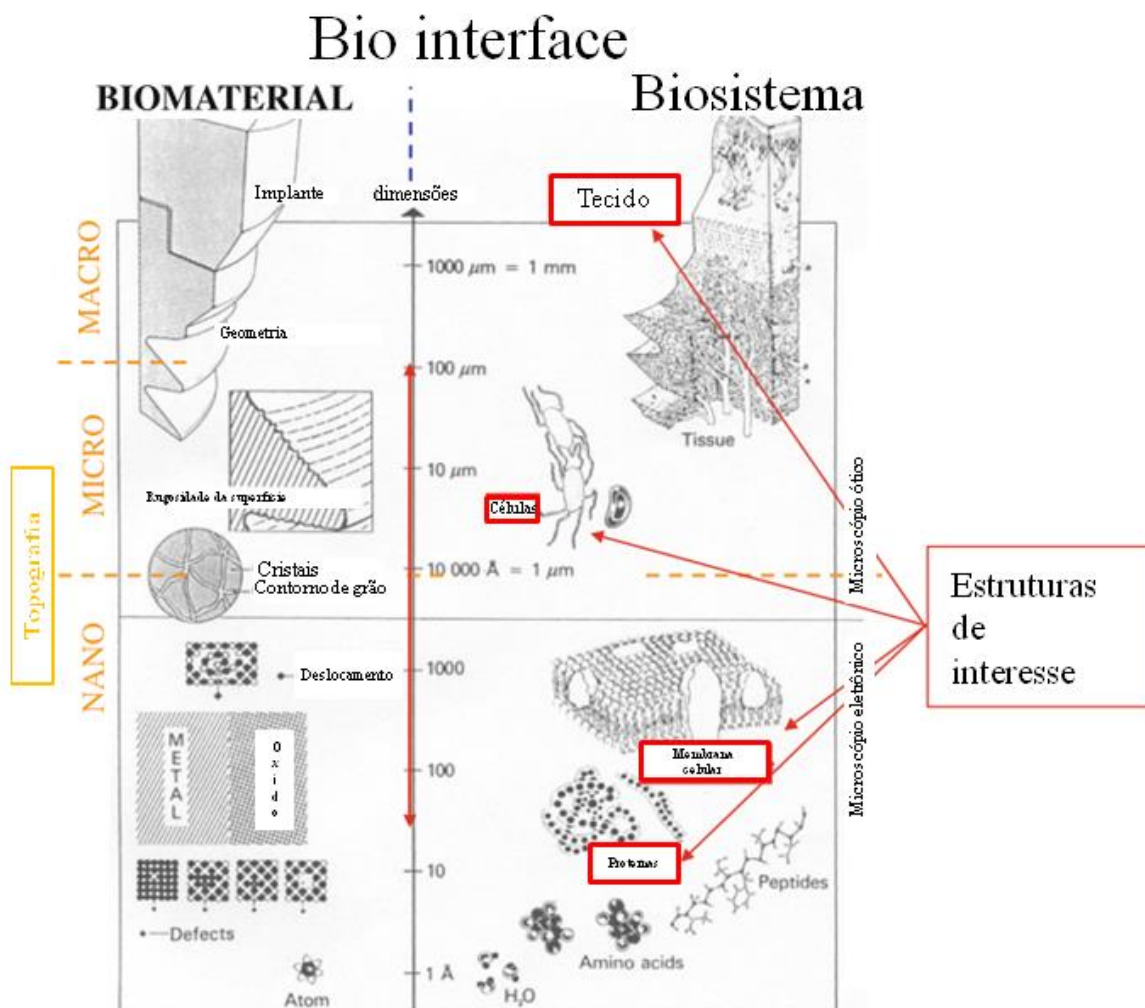
A combinação entre as propriedades mecânicas gerada pela fase β e as propriedades físico-químicas conferem ao material boa perspectiva para aplicação biomédica.

2.3 TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE

No campo biomédico, a falha do implante pode estar associada a uma fixação insuficiente ao tecido ósseo e conseqüente formação de tecido fibroso perto do implante (MA *et al.*, 2011).

Os tratamentos de superfície são importantes, pois eles modificam as características físicas e químicas da superfície do material em diferentes escalas sem alterar as propriedades de volume do material, melhorando a interação na interface implante/osso como visto na Figura 7 (ANSELME, 2011).

Figura 7 - Esquema representativo dos diferentes níveis de estruturas presente no implante e no tecido



Fonte: Adaptado de Anselme (2011)

Um dos métodos empregado para a modificação da superfície de ligas de titânio, é o crescimento de nanotubos de TiO_2 . Para este crescimento, existem diversas técnicas incluindo o método hidrotérmico (NIU *et al.*, 2008), sol-gel (AYALA *et al.*, 2009), método do molde (NA *et al.*, 2008), a irradiação por micro-ondas (RIBBENS *et al.*, 2008), síntese alcalina (ARRUDA *et al.*, 2015), oxidação anódica (ESCADA *et al.*, 2013).

Dentre estes métodos, a oxidação anódica é amplamente utilizada devido a simplicidade do processo, a obtenção de resultados reproduzíveis, a viabilidade de ajustar o tamanho e a forma das camadas nanotubulares às dimensões desejadas e atender às demandas de aplicações específicas. Além disso, a espessura e a morfologia do filme de

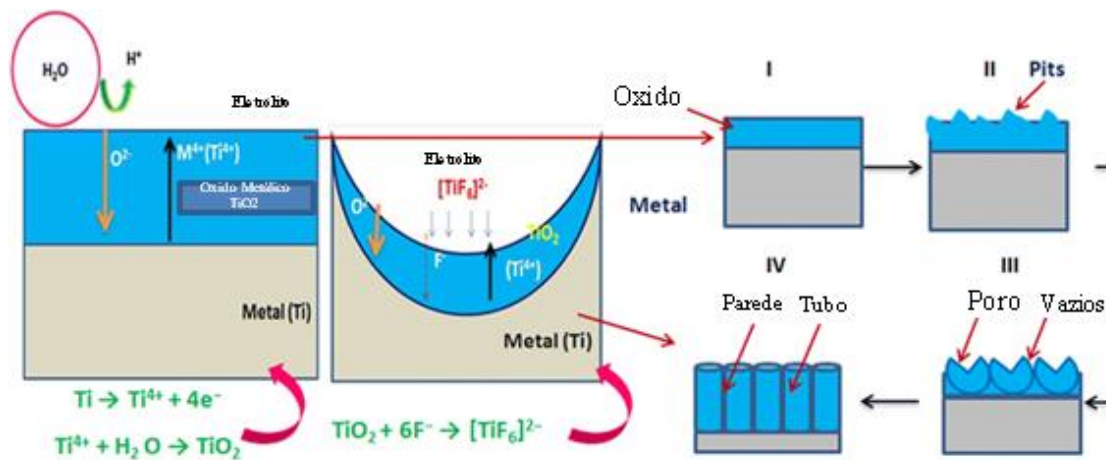
TiO₂ podem facilmente ser controlados pelos parâmetros de anodização e os nanotubos obtidos apresentam boa adesão ao substrato (YIN *et al.*, 2010; MURA *et al.*, 2009).

A interação do implante ocorre somente na superfície do material implantado com o sistema biológico.

2.3.1 Oxidação anódica

O mecanismo de formação dos nanotubos é o resultado de dois processos que ocorrem simultaneamente: oxidação da superfície do material e a dissolução controlada desta camada de óxido. O processo de dissolução da camada de oxido inicia com a formação de pequenos poros, que irão crescer e ocorrerá a união dos poros adjacentes, formando uma rede de poros alinhados e então a formação das matrizes de nanotubos (ZHAO *et al.*, 2005). Na Figura 8 é possível observar esse mecanismo de formação dos nanotubos de TiO₂.

Figura 8 - Mecanismo de formação dos nanotubos de TiO₂.

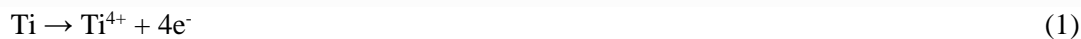


Fonte: Indira *et al.*, 2015

Os íons fluoreto são necessários para a formação da película porosa (RAJA *et al.*, 2005). O íon fluoreto (F⁻) é um fator essencial para a formação de estrutura tubular devido à sua capacidade de formar o complexo de hexafluoreto de titânio solúvel ([TiF₆]²⁻). Além disso, tem um pequeno raio iônico que o torna adequado para entrar na crescente rede de TiO₂ e atravessar o óxido, agindo como agente de dissolução de óxido (XU *et al.*, 2008).

As equações das reações envolvidas nesse processo podem ser divididas em 3 etapas (KIM *et al.*, 2008):

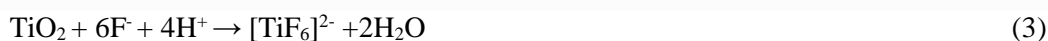
1) Oxidação do Ti



2) Formação de camada de óxido

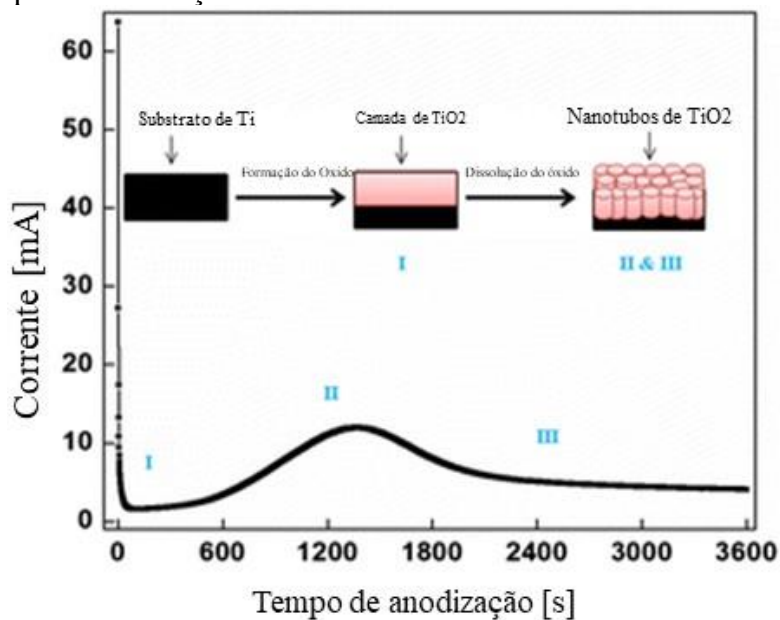


3) Dissolução da camada de óxido



A equação 1 mostra a oxidação de Ti em Ti^{4+} . De acordo com a equação 2, íons H^+ são acumulados durante a hidrólise, os íons F^- migram para os sítios do H^+ procurando eletroneutralidade, então os íons de F^- competem pelos sítios de O_2 no óxido. Quando a concentração destes íons chega ao nível crítico na região, ocorre a dissolução do TiO_2 pela formação de $[\text{TiF}_6]^{2-}$ (equação 3). A dissolução do $[\text{TiF}_6]^{2-}$ leva a criação de vacâncias carregadas negativamente no óxido e migrando para interface metal/óxido devido ao gradiente de potencial através do óxido. A presença das vacâncias perto da interface metal/óxido facilita a reação (equação 1) e o Ti^{4+} pode facilmente mover para vacância situada. Durante este estado, nanoporos são nucleados na superfície de óxido. (Figura 9)

Figura 9 - Ilustração esquemática da formação dos nanotubos e a curva da densidade de corrente pelo tempo de anodização.



Fonte: (INDIRA et al., 2015)

Uma vez que os pequenos poros iniciais são muito estreitos, íons H^+ são gerados na parte inferior do poro, dissolvem-se na solução e a concentração de HF aumenta rapidamente no interior dos poros. A alta concentração de HF faz com que a parede dos poros se dissolva até que as paredes dos poros adjacentes desapareçam. Ao mesmo tempo, a integração por pequenos poros resulta no aparecimento de poros maiores (YIN *et al.*, 2007). Simultaneamente, a dissolução assistida por campo elétrico aumentada no fundo do poro leva ao aprofundamento do poro e os vazios começam a formar-se. Devido ao campo elétrico aplicado, a ligação Ti-O sofre polarização e enfraquece, promovendo a dissolução do óxido (BAI *et al.*, 2008).

A formação do filme ordenado é guiada principalmente pela distribuição do potencial na superfície do Ti. Dois poros adjacentes tendem a crescer juntos até que a fase condutora de Ti entre eles não seja oxidada. Assim que a fase metálica é oxidada, a espessura da camada de óxido aumenta e a força do campo elétrico na camada de barreira diminui drasticamente, o que resulta na diminuição da taxa de migração dos íons O^{2-} através do filme. Os distância de difusão de O_2^- são praticamente iguais para todos os poros e a estrutura tende a formar uma matriz espacialmente ordenada com densidade de empacotamento máxima (MACAK *et al.*, 2005).

Durante a anodização, ocorrem alterações de cor na camada de TiO_2 , passando muito rapidamente do roxo para o azul, amarelo e verde. Essa mudança de cor é devido ao aumento da espessura do TiO_2 (SETZU *et al.*, 2002).

Existem vários parâmetros que interferem na formação dos nanotubos de TiO_2 , tais como, natureza e concentração do eletrólito, pH do eletrólito, tempo, potencial e temperatura.

2.3.2 Eletrólito

A natureza do eletrólito utilizado para a formação dos nanotubos de TiO_2 influencia fortemente a estrutura obtida. Diferentes estruturas de óxido de titânio tais como o óxido compacto plano, uma camada porosa desordenada, uma camada porosa organizada, ou uma camada nanotubular altamente organizada podem ser formados (TAVEIRA *et al.*, 2005).

Semelhante a divisão proposta por Grimes e Mor, Kulkani *et al.* (2016) divide as gerações dos eletrólitos pelo tipo de solução em que é diluída o ácido fluorídrico ou sal de fluoreto, soluções ácidas (geração I), em sais básicos (geração II), em eletrólitos orgânicos

com pequenas adições de água (geração III). Os eletrólitos mais utilizados atualmente são os baseados em glicerol e etileno glicol, por apresentarem um crescimento mais uniforme.

De acordo com Indira *et al.* (2015), os eletrólitos são classificados como orgânico (ou neutro) e ácidos. Um eletrólito orgânico tem uma pequena quantidade de oxigênio e água em comparação com um eletrólito ácido. Estudos realizados em eletrólitos orgânicos como $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{NH}_4\text{F}$ (KANECO *et al.*, 2007) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 / \text{NH}_4\text{F}$ (TSUCHIYA *et al.*, 2007) resultaram em camadas de nanotubos mais longos e auto organizados. Esses eletrólitos são mais viscosos e criam dois ambientes diferentes ao longo dos nanotubos, um inerte no topo e outro quimicamente reativo no fundo. Assim, a inibição da dissolução do óxido no lado superior do nanotubo permite a formação de uma camada mais densa (VEGA *et al.*, 2008).

Indira *et al.* (2012) estudaram as diferentes composições de eletrólitos e concluíram que a natureza e a concentração do eletrólito, interferem no diâmetro e comprimento da estrutura porosa. Para o eletrólito aquoso, 0,13M de H_2SO_4 e 0,1M de HF, o diâmetro médio dos poros foi de 64 nm e o comprimento de 100nm, e para o eletrólito orgânico 0,13M de glicerol e 0,1M de HF, o diâmetro obtido foi de 84 nm e o comprimento em torno de 100nm. Quando a concentração de HF em ambos os eletrólitos foi modificada para 0,15M, não houve formação de estrutura porosa. Neste estudo, o potencial utilizado foi de 40V e a calcinação de 450 °C.

Um outro trabalho, realizado por Tian e seu grupo, 2007, utilizando como eletrólito o H_2SO_4 e NH_4F a 0,5%, com potencial de 20V por 60 minutos, exibiu uma variação no comprimento do tubo, que depende da concentração do H_2SO_4 . Em 0,24 mol L^{-1} de H_2SO_4 o diâmetro foi de 120 nm, enquanto em 1,75 mol L^{-1} de H_2SO_4 esse diâmetro diminuiu para 100nm

Xu *et al.* (2015) estudaram a concentração de NH_4F em etileno glicol e verificaram que em 0,10% de NH_4F , apenas uma estrutura porosa foi formada, e em 0,50% de NH_4F a estrutura nanotubular foi obtida.

2.3.3 Potencial

O potencial aplicado durante a oxidação anódica influencia fortemente o diâmetro dos poros, a distância entre os poros e espessura da camada formada (KIM *et al.*, 2008).

Tsuchiya *et al.* (2005), utilizando CH_3COOH com 0,5% de NH_4F estudaram a influência do potencial de oxidação anódica na formação dos nanotubos, Com potencial de 30V, foram observados nanotubos com 100nm de comprimento e 30nm de diâmetro. Um aumento para 50V, alterou apenas em 20nm esse diâmetro. No entanto, em potenciais superiores a 50 V, há variações na morfologia, que resultaram na formação de estruturas semelhantes a recifes de corais. Essa cobertura se torna mais homogênea com o aumento do potencial até 120V.

A dissolução química da camada de TiO_2 desempenha um papel crucial na formação dos nanotubos. A taxa de dissolução química do TiO_2 é um processo altamente dependente do pH e geralmente, essa taxa de dissolução é elevada nos eletrólitos ácidos. Um potencial elevado tende a gerar uma dissolução permanente da camada de óxido e nenhuma formação de tubo poderá ser observada (MACAK e SCHMUKI, 2006). Portanto, potencial mais baixas são ideais para eletrólitos ácidos e potencial mais elevadas para os eletrólitos orgânicos.

2.3.4 Tempo de anodização

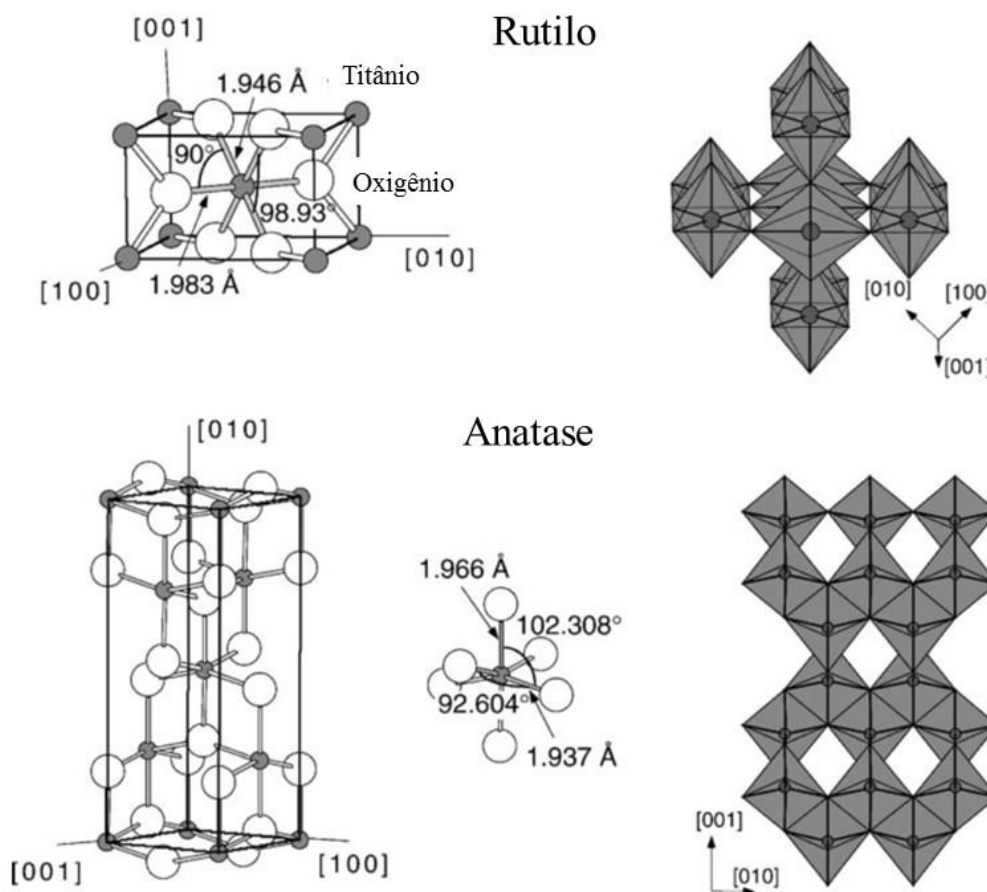
O tempo de anodização também influencia muito no mecanismo de formação dos nanotubos. Não existe nanotubos, se o tempo de anodização for muito curto. De acordo com Li *et al.* (2014), o mínimo de tempo necessário para a formação de nanotubos é de 15 minutos e com aumento do tempo, nanotubos altamente ordenado podem ser formados. Similarmente, Regonini e Clemens (2015) descobriram que com 5 minutos de anodização, somente a estrutura nanoporosa foi formada, e somente após 10-20 minutos, a estrutura nanotubular foi claramente visível.

Em estudo inédito, So *et al.*, (2012) demonstraram que nanotubos altamente ordenados com 7 μm de espessura podem se formar em 25 segundos utilizando ácido láctico no eletrólito. Eles mostraram que o ácido láctico pode efetivamente impedir a decomposição dielétrica localizada do óxido em altas tensões de anodização, permitindo assim, estabelecer um transporte maior de íons através da película de óxido e, como resultado, velocidades de crescimento de tubo extremamente rápidas sem perder as propriedades funcionais do tubo. Ao prolongar o tempo de anodização, o comprimento dos nanotubos aumenta, no entanto após 1 hora de anodização, os nanotubos desabam.

2.3.5 Calcinação

A formação do óxido de titânio após a anodização resulta em uma estrutura cristalina hidratada ou amorfa. O óxido de titânio (TiO_2) pode assumir a forma cristalina de anatase, rutilo (Figura 10) e brookita. Essas fases são formadas pelo tratamento térmico do TiO_2 amorfo em diferentes temperatura e tempo. (CHAVES, 2016; SHIVARAM, 2014; FANG, 2011)

Figura 10 - Estrutura das fases anatase e rutilo do óxido de titânio

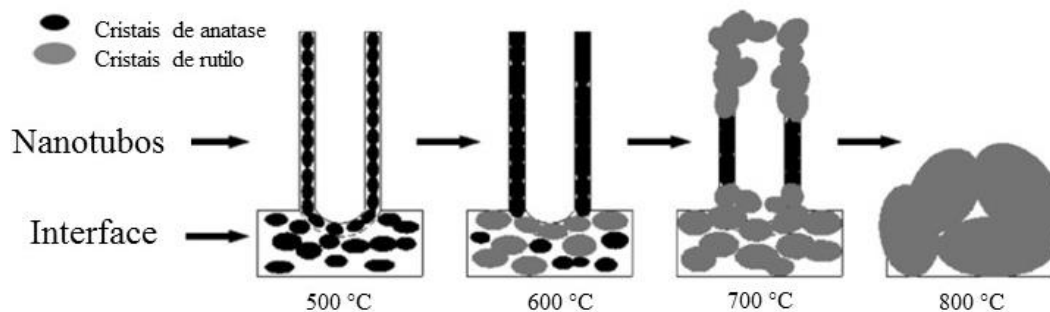


Fonte: Diebold 2003

Yu (2010) estudou a anodização do Ti-CP em uma solução de 1:1 água e glicerol e 1 % massa/volume de NH_4F , calcinando as amostras em diferentes temperaturas de 300 – 800 °C por 2 horas. Na temperatura de 300-500 °C somente a fase anatase foi identificada, da temperatura de 600-700 °C há presença das fases anatase e rutilo e em 800 °C somente o rutilo foi encontrado (figura 11), mas a estrutura de nanotubos é destruída, formando uma

camada de óxido densa. Yu propôs o esquema da Figura 11 para explicar a mudança de morfologia conforme o aumento da proporção entre a quantidade de anatase/rutilo que ocorre com o aumento da temperatura de calcinação dos nanotubos.

Figura 11 - Esquema do crescimento dos cristais da fase anatase e do rutilo na estrutura dos nanotubos em função da temperatura. Esquema proposto por Yu (2010)



Fonte: Yu (2010)

Yan e coautores (2013) caracterizaram a formação das fases de anatase e rutilo em diferentes temperaturas. Verificaram que a fase rutilo é a mais estável e que a fase anatase pode transformar para a fase rutilo, quando aquecida a uma temperatura entre 500 -700 °C.

Chaves *et al.* (2016) estudou a estabilidade térmica do TiO₂ obtido por oxidação anódica da liga Ti7,5Mo. Em seu trabalho a temperatura de calcinação entre 400-500 °C formou somente a fase anatase, a temperatura de 600-800 °C apresentou as fases anatase e rutilo.

Brammer *et al.* (2009) estudou a influência do diâmetro dos nanotubos de óxido de titânio com o crescimento celular de osteoblastos. Demonstraram que as células têm comportamento diferente em função da morfologia dos nanotubos. Quando o diâmetro é reduzido (30 nm de diâmetro), ocorre melhor proliferação celular, enquanto para diâmetros entre 70-100 nm um alongamento maior das células.

2.4 FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

A superfície de nanotubos geram uma maior área superficial e um ambiente propício para o desenvolvimento celular (CAPELLATO *et al.*, 2012) (HAO *et al.*, 2013)(BRAMMER; FRANDSEN; JIN, 2012) (SIOW *et al.*, 2006) (ANSELME, 2011)(ZHONG *et al.*, 2014), uma grande preocupação é a pesquisa por métodos de evitar ou reduzir a contaminação dessa

superfície como visto em trabalhos de Popat *et al.* (2007), Kummer *et al.* (2013), Zhao *et al.* (2010), Gulati *et al.* (2012), Zhang *et al.* (2014) e Hu *et al.* (2012).

Um grande número de pesquisas está sendo desenvolvidas com polímeros para aplicação biomédica e sua aplicação para funcionalização de superfície. Alguns exemplos de polímeros em desenvolvimento para aplicação biomédica são: polidopamina (LEE *et al.*, 2012) (SAIDIN *et al.*, 2013), quitosana (LAWRIE *et al.*, 2007) (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999) (AMARAL; GRANJA; BARBOSA, 2005), ácido hialurônico (KOGAN *et al.*, 2007).

A quitosana (CHI), um polissacarídeo proveniente do exoesqueleto de crustáceos, um biopolímero que apresenta propriedades bactericidas e devido aos grupos amina, presente nas cadeias, é biodegradável e não apresenta uma resposta imunológica quando liberada no corpo humano (HERNÁNDEZ-MONTELONGO *et al.*, 2016b) (LAWRIE *et al.*, 2007)(VICENTINI; SMANIA; LARANJEIRA, 2010).

O ácido hialurônico (HA) é um polímero de alto peso molecular e tem uma estrutura molécula similar à da quitosana, como podemos ver na Figura 12. O ácido hialurônico foi utilizado para recobrir o aço inoxidável, reduzindo ou evitando os problemas que alguns metais apresentam quando em contato com os fluidos corpóreos, como relatado por estudo de Pitt *et al.* (2004).

No trabalho de Chua *et al.* (2008), o ácido hialurônico foi utilizado em conjunto com a quitosana para imobilizar um tipo de peptídeo, resultando em uma melhora significativa na adesão de osteoblastos.

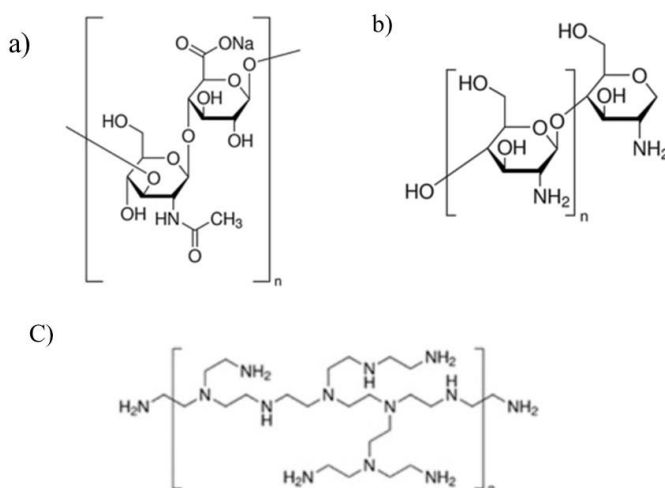
A polietilenoimina (PEI) foi utilizada em trabalhos como um revestimento precursor para a formação de polímeros em multicamadas, foi utilizado para revestir a superfície do material e formar uma superfície com características eletrostáticas de carga positiva, atraindo monômeros com características de cargas opostas, dando início a formação dos filmes poliméricos de multicamada. Hernandez *et al.* (2017) avaliaram a formação de um filme ultrafino de PEI confirmando a presença de radicais NH_3^+ , que conferia propriedades bactericidas.

Devido as propriedades apresentadas pela polietilenoimina, quitosana e do ácido hialurônico, esses três polímeros foram utilizados em pesquisas para o recobrimento de superfícies conferindo propriedades antimicrobianas, como visto em trabalhos Hernández-

Montelongo *et al.* (2016, 2017), Chua *et al.* (2008). Nesses trabalhos foram feitos filmes finos utilizando a técnica layer-by-layer, isso foi possível devido ao caráter cátion/ânion iônico dos monômeros.

que formam um filme com características positiva ou negativa e quando imersos em uma solução com os monômeros com cargas opostas, eles são atraídos por forças eletrostáticas, iniciando a polimerização de outro filme com carga oposta. Esse processo se repete em função do número de camadas desejadas.

Figura 12 - estrutura molecular do monômeros a) quitosana, b) ácido hialurônico e c) polietilenoimina



Fonte: Adaptação de HERNÁNDEZ-MONTELONGO *et al.*, 2016 e 2017

2.4.1 Nanopartículas de óxido de zinco

Padmavathy *et al.* (2008) mostraram que partículas de óxido de zinco (ZnO) tem uma relação inversamente proporcional ao tamanho de partícula com a atividade bactericida da partícula. Abaixo da concentração de 1 mM, não apresentou propriedade bactericida, enquanto acima de 1 mM mostrou eficiente para esta finalidade. A mesma relação envolvendo o tamanho de partículas e a atividade bactericida foi observada por Zhang *et al.* (2007). Além do tamanho de partículas, a concentração de partículas está diretamente relacionada com a atividade bactericida.

Vicentini *et al.* (2010) estradaram filmes de quitosana e poli vinil álcool com nanopartículas de ZnO, mostrando-se eficiente contra a espécie *Staphylococcus aureus*.

Bui *et al.* (2017) avaliaram o uso da quitosana e nanopartículas de ZnO, TiO₂ e Ag, concluindo que a combinação da quitosana com as nanopartículas melhoravam a propriedade bactericida e aceleravam o tempo de cura.

2.5 IN VITRO

2.5.1 Crescimento Bacteriano

Os biofilmes são compostos de microrganismos embutidos dentro de uma matriz autoproduzida de biopolímero, e a formação destes biofilmes é uma função crítica em superfícies implantáveis (DAVEY *et al.*, 2000). Além de sua importância para a função bacteriana, biofilmes representam o arranjo mais comum de bactérias no ambiente e a inibição do biofilme é benéfica contra as bactérias resistentes aos antibióticos, enquanto que a adesão celular é importante nos implantes médicos de TiO₂.

O efeito positivo de substratos de titânio anodizado na integração de tecidos de implantes está bem documentado, no entanto a sua atividade antimicrobiana, incluindo propriedades anti-adesivas e anti-biofilme são controversas.

De um lado, Puckett *et al.* (2010) em estudos de adesão de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* às superfícies de titânio nanotubulares encontraram grande adesão microbiana, resultante da maior rugosidade das superfícies nanoestruturadas em comparação com titânio puro (liso). Um outro estudo, abordando a síntese de nanofilmes finos de TiO₂ nanoestruturados e o estudo de cultura bacteriana mostraram que, a interação das espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com superfícies nanoestruturadas mostra um aumento na adesão e formação de biofilmes com o aumento das propriedades morfológicas em nanoescala (SINGH *et al.*, 2011)

Por outro lado, demonstrou-se a inibição da adesão dessas mesmas bactérias em titânio rugoso criado pela evaporação do feixe de elétrons (IVANOVA *et al.*, 2010). Após 2 dias de cultura, observaram uma diminuição significativa na formação de biofilmes de *S. aureus* em titânio nanotubular anodizado, enquanto, a aderência inicial de estafilococos (1-8 h) em superfícies nanotubulares foi mais forte em comparação com o titânio convencional. Foi sugerido que a presença de flúor nas superfícies anodizadas do Ti poderia explicar esse efeito anti-biofilme.

Já Lewandowska *et al.* (2015) obtiveram nanotubos de TiO₂ muito definidos que funcionaram como inibidores para a formação de biofilme de duas cepas de *S. aureus*, mostrando o efeito da nanotopografia ao invés de sua composição química. Mesmo que as propriedades antimicrobianas do biomaterial testado estivessem associadas à presença de flúor na camada superior das superfícies nanotubulares anodizadas após a utilização de HF como eletrólito durante o processo de anodização, todos os tipos de coberturas com nanotubos deveriam possuir atividade similar. Nesse estudo, o crescimento dos nanotubos foi dependente de tensões aplicadas. A atividade mais notável de todas as superfícies testadas contra agregados de *S. aureus* / formação de biofilme (independentemente da estirpe utilizada) foi observada para os revestimentos formados com potencial de 4V, com estrutura amorfa e nanotubos com diâmetro de cerca de 20-30 nm. Similarmente, Ercan *et al.* (2011) relataram um número reduzido de estafilococos vivos que aderem à superfície de nanotubos com um diâmetro de 30-80 nm.

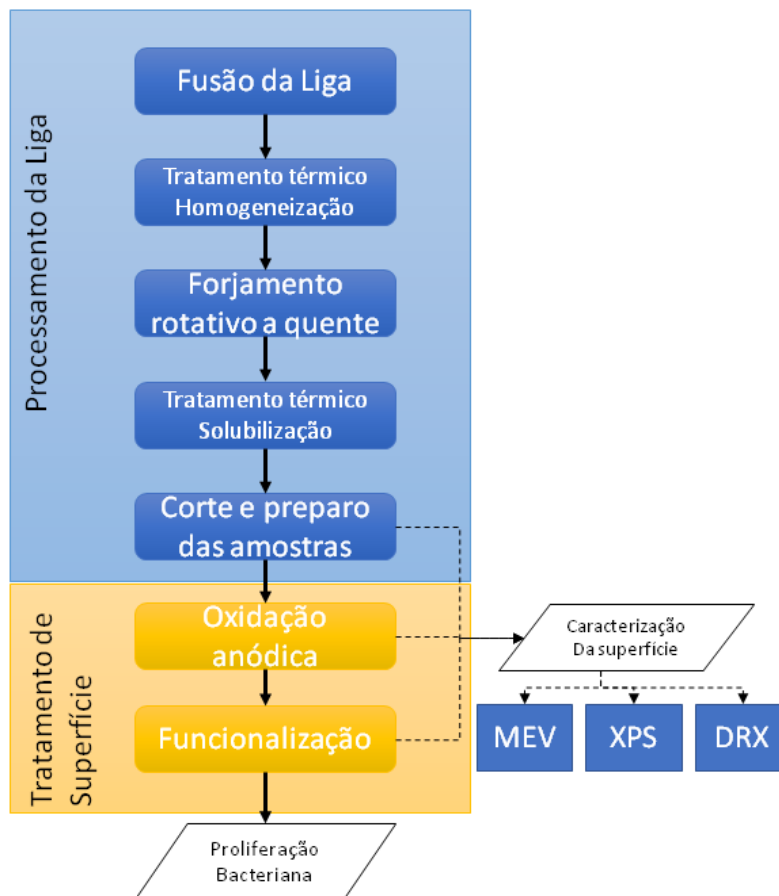
Curiosamente, Cendrowki *et al.* (2014) observaram forte atividade antibacteriana (contra *Escherichia Coli*) de titânio nanocristalino coberto de nanotubos. No entanto, esse efeito foi observado após irradiação superficial com a luz visível e ultravioleta artificial e baseou-se numa atividade fotocatalítica bem conhecida de titânia na estrutura de anatase. Também outros pesquisadores relataram diminuição da adesão microbiana ao TiO₂ cristalino (anatase ou rutilo) mesmo sem estimulação leve (ERCAN *et al.*, 2011).

Um dos ensaios utilizados para avaliação da viabilidade celular é o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium), avaliando a atividade metabólica da célula pela conversão do sal de MTT, por enzimas, em cristais de Formazan, como fora utilizados em trabalhos de Capellato *et al.* (2012) e Ferraris *et al.* (2014) para avaliar a atividade celular. O mesmo ensaio também é utilizado para avaliar a proliferação bacteriana, visto que a redução do sal de MTT não é realizado apenas pela mitocôndria, mas como por outras partes do microrganismo sendo utilizado para avaliar a atividade metabólica dos mesmos, e como utilizados trabalhos de Paula Ramos *et al.* (2016) e Cheng *et al.* (2017) que utilizaram o sal de MTT para avaliar a proliferação bacteriana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada no desenvolvimento dessa pesquisa foi dividida em três etapas: processamento da liga, tratamento de superfície e caracterização das superfícies conforme fluxograma da Figura 13.

Figura 13 - Fluxograma empregado no desenvolvimento do trabalho, dividido nas três etapas.



Fonte: Produção do autor

3.1 PROCESSAMENTO DA LIGA

A liga Ti15Zr15Mo utilizada neste trabalho foi obtida fusão seguindo a rota de processamento proposta por Alves (1998). O processo de fusão da liga, e tratamentos térmicos foram realizados na FEG/UNESP.

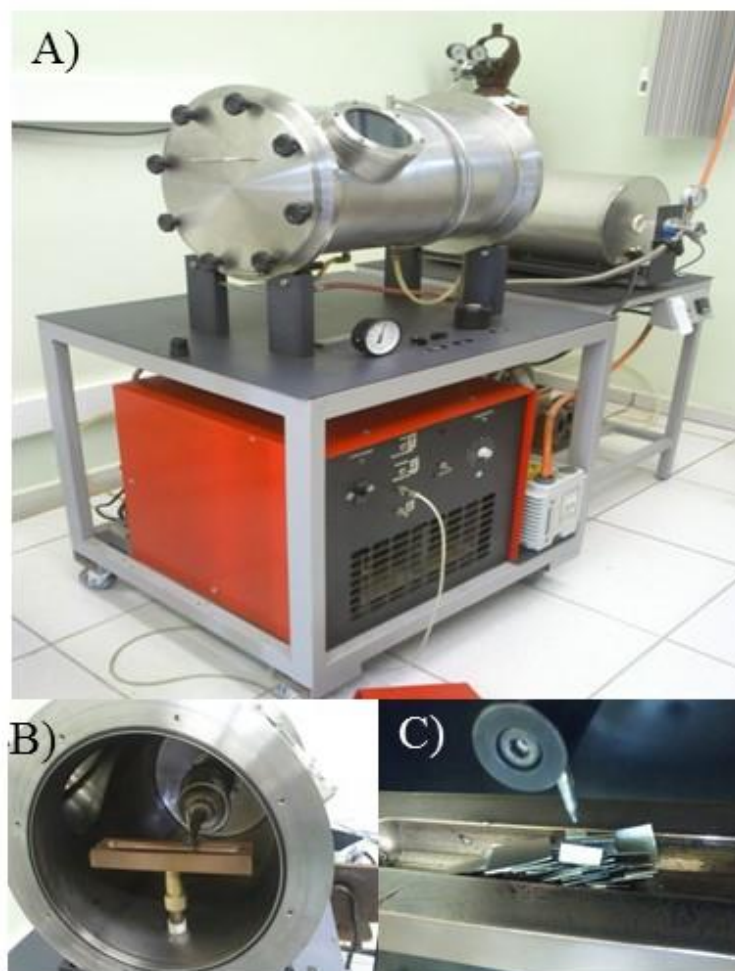
A fusão dos elementos puros Ti, Zr, Mo foi realizada em um forno a arco voltaico com atmosfera controlada. Os materiais foram recebidos na forma de chapas e arames, cedidos

pelo Professor Dr. Roberto Grandini (FC/UNESP), que foram cortados utilizando tesoura de bancada, e alicates de corte em pequenos pedaços. Todo o material passou pelo processo de decapagem química utilizando a solução formada por ácido fluorídrico e ácido nítrico (1:3).

A solução foi colocada em um béquer e os metais foram mergulhados dentro da solução até a remoção das impurezas. O material foi retirado da solução e lavado em água corrente por alguns minutos para remover resíduos da solução de decapagem e secos com convecção forçada.

Após a limpeza os metais foram pesados de acordo com a composição da liga Ti15Zr15Mo (% peso) e colocados no cadinho de cobre no interior do forno (Figura 14). Em seguida, a câmara foi fechada e feito a purga para remoção das impurezas da câmara por meio do vácuo e injeção de argônio alternadamente, garantindo que dentro da câmara não ficasse resíduo de outros gases que pudessem contaminar a liga durante a fusão da liga que foi fundido por 10 vezes.

Figura 14 - Equipamento de Fusão, A) Forno de fusão, B) cadinho de cobre refrigerado à água e eletrodo de tungstênio, C) Material para fusão



Fonte: Produção do autor

Após a fusão da liga, para garantir a composição química homogênea foi realizado o tratamento térmico de homogeneização em um forno tubular, com atmosfera inerte de argônio a uma temperatura de 1000 °C durante 24 horas, com resfriamento dentro do forno. Devido à dureza do material foi realizado o forjamento a quente dos lingotes tratados para a obtenção de barras com 10 mm de diâmetro. Essa etapa foi realizada no Instituto Tecnológico Aeronáutico (ITA) no equipamento FEN 5F. Para o forjamento a quente, os lingotes foram aquecidos em um forno com temperatura de 1000 °C durante 15 minutos e. O equipamento possui martelos com diferentes diâmetros que atingem o material, esses martelos têm que ser trocado a cada passe, reduzindo assim o diâmetro do lingote e conferindo uma forma regular. Ao final do processo, o lingote apresentou rebarbas e óxidos formados pelo trabalho a quente,

os quais foram removidos com um esmeril para remover o óxido e as rebarbas geradas pelo processo.

Após o forjamento foi realizado o tratamento térmico de solubilização para estabilizar a fase β . O lingote foi posicionado sobre um cadinho de alumina e posicionado no forno tubular com atmosfera de inerte de argônio. O forno foi aquecido com uma taxa de 16.6 °C/min até 950 °C durante 120 min com resfriamento brusco em água.

Discos com 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram seccionados das barras utilizando um equipamento de corte de precisão Isomet 1000 (Buehler), utilizando discos diamantados, equipamento do laboratório de Biomateriais da FEG/UNESP.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA LIGA Ti15Zr15Mo

A microscopia óptica foi empregada para avaliar a microestrutura da liga após processamento da liga. O processo de metalografia convencional consiste no lixamento das amostras utilizando lixa abrasiva de carbetto de silício com granulometrias de #100 até #1500, seguido de limpeza em banho ultrassônico em água por 15 min antes do polimento com sílica coloidal em suspensão. As amostras foram limpas em banho ultrassônico em água deionizada durante 15 min e álcool durante 15 min, secas com convecção de ar. O ataque químico foi realizado utilizando a solução de Keller (1ml de HF(40%PA), 3ml de HCl (65%PA), 5ml de HNO₃ (65%PA) e 190ml de H₂O) por imersão durante 4 min. A amostra foi analisada no microscópio ótico Nikon Epiphot 200 no laboratório de microscopia da FEG/UNESP.

A difração de raios-X foi realizada no departamento de materiais (Demar) USP campus Lorena, utilizando o equipamento Empyrean da Panalytical. Para análise foi utilizado radiação Cu K α , corrente de 30 mA e tensão de 40 kV, com intervalo de medição de 20° até 90°, passo de 0,02° e tempo de contagem de 15 s.

3.3 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE

3.3.1 Oxidação anódica

Antes da oxidação anódica as amostras passaram pelo processo de lixamento úmido utilizando lixas de carbetto de silício de granulometrias 100 até 600, seguidos por limpeza em

banho ultrassônico em água deionizada e em álcool etílico por 15 min e secas com convecção de ar.

Os fatores que devem ser considerados no processo de anodização da liga são: eletrólito, tempo e potencial. Em estudos anteriores, os sistemas binários Ti15Mo (RANGEL; ESCADA; ALVES CLARO, 2013) e Ti15Zr (Anexo A) foram estudados para encontrar os parâmetros de anodização. No presente trabalho, foi analisada a influência da tensão e do tempo de anodização (Tabela 4), mantendo-se a composição do eletrólito. A solução utilizada como eletrólito foi preparada dissolvendo 2,7 g de fluoreto de amônio (NH_4F) em 500 mL de água deionizada, então foi adicionado 500 mL de glicerol, agitando até a total homogeneização.

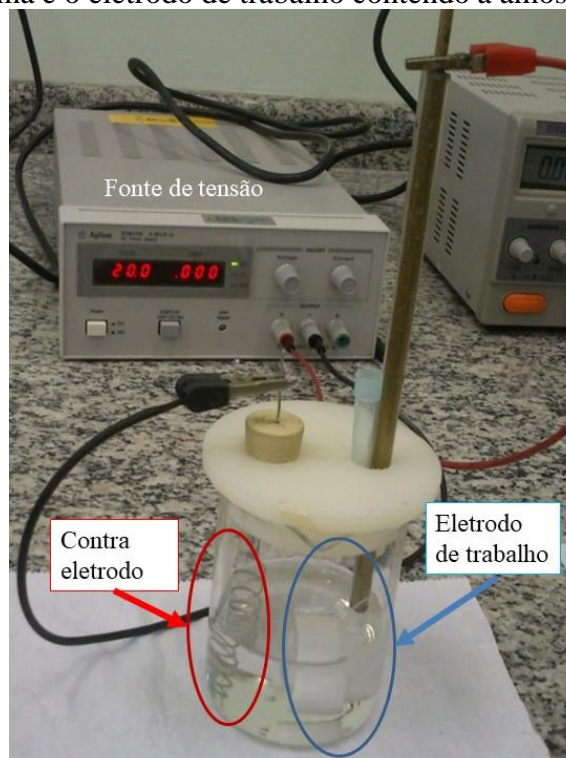
Na figura 15 é mostrado o conjunto empregado para anodização das amostras formado por fonte de tensão corrente contínua, eletrodo de platina (contra eletrodo), suporte de amostra (eletrodo de trabalho). A amostra foi fixada no porta amostra e conectada à fonte de tensão, o contra eletrodo foi conectado e posicionado na célula eletrolítica, foi adicionado o eletrólito até cobrir a amostra (75 mL de solução). O potencial foi ajustado com uma taxa de 1 V/min até atingir a tensão de trabalho que será mantida durante o tempo determinado para análise. O processo de anodização foi realizado no laboratório de Biomateriais da FEG/UNESP.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados na anodização.

Eletrólito	Potencial (V)	Tempo (h)
Água deionizada + glicerol + fluoreto de amônio	20	6
		24
	30	6
		24

Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 15 - Equipamento para anodização, constituído por uma fonte corrente contínua, um eletrodo auxiliar de platina e o eletrodo de trabalho contendo a amostras da liga.



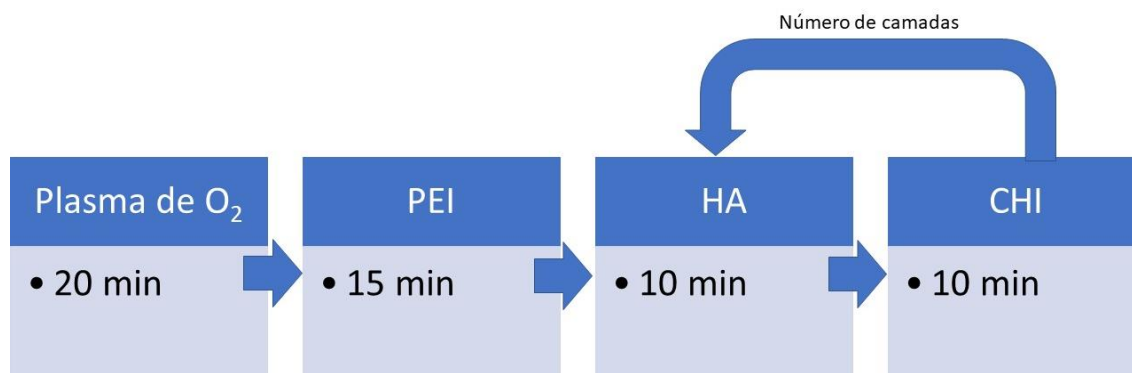
Fonte: Produção do autor

Decorrido o tempo de anodização, as amostras foram retiradas e limpas com água deionizada em banho ultrassônico por 5 min. O excesso de água foi removido com o auxílio de um soprador térmico. Após a oxidação as amostras com nanotubos de TiO_2 foram tratadas termicamente para estabilização da fase anatase como visto no trabalho de Chaves *et al.* (2016), para isso foram calcinadas em um forno tipo mufla a $450\text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min com taxa de aquecimento de $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, permanecendo no forno até se resfriamento, para assim serem guardadas no dessecador.

3.3.2 Funcionalização da superfície e incorporação de ZnO

O recobrimento com filme polimérico empregando polietilenoimina (PEI), ácido hialurônico (HA), quitosana (CHI) foi realizado em parceria com o grupo de pesquisa coordenado pela Professora Dra. Marisa Beppu da Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, seguindo a metodologia preconizada em estudos anteriores do grupo (HERNANDEZ-MONTELONGO *et al.*, 2017), de acordo com o fluxograma da figura 16.

Figura 16 - Fluxograma do processo de recobrimento *layer-by-layer*.



Fonte: Produção do autor

A técnica envolve primeiramente o preparo das soluções nas 24 horas que antecedem o recobrimento das superfícies com polímero. Para a solução de polietilenoimina (PEI) foi adicionado 1 g do monômero em 1 litro de água ultrapura e 100 mM NaCl. A solução permaneceu em um agitador magnético por uma noite para melhor homogeneidade da solução. A solução de ácido hialurônico (HA) foi obtida a partir da dissolução de 1 g do sal em 1 litro de água ultrapura, também com agitação magnética por 24 horas. A solução de quitosana (CHI) foi preparada a partir de 1 g do monômero em 1 litro de água ultrapura com 100 mM de ácido acético, novamente com agitação magnética durante as 24 horas que antecedem a deposição.

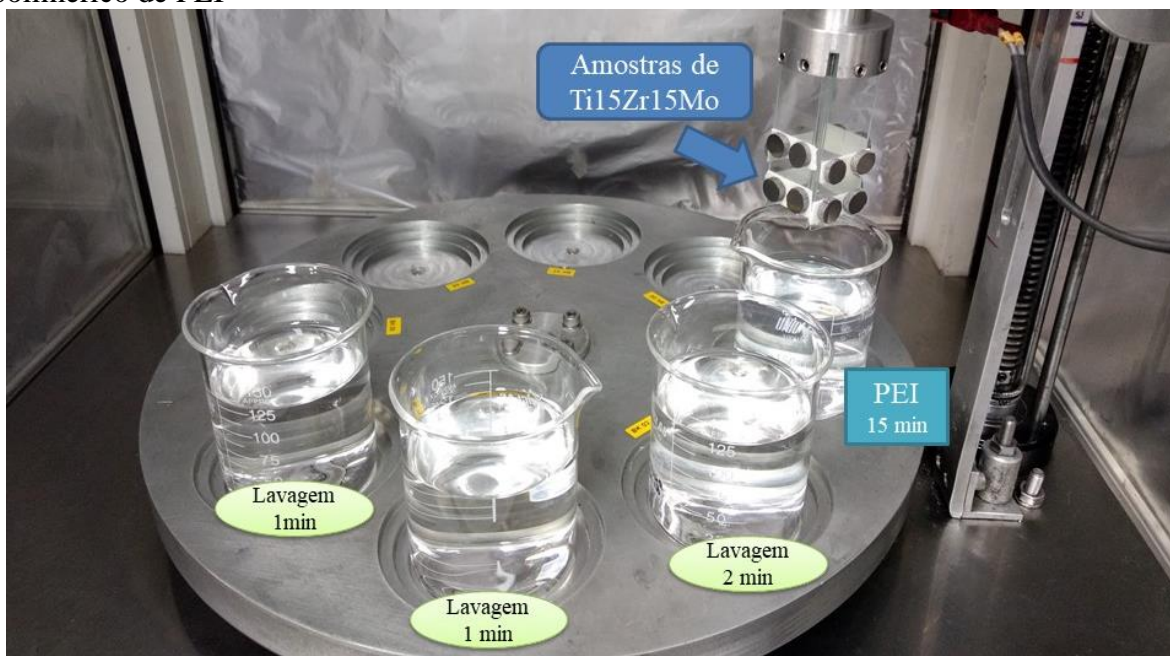
No momento da deposição, o pH das soluções de cada monômero precisou ser ajustado inicialmente de 7 para 3 utilizando ácido clorídrico (HCl) (1 Mol) e NaOH (1 Mol).

Antes da deposição dos polímeros, as amostras passaram por um pré-tratamento utilizando plasma em atmosfera de oxigênio para criar sítios ativos e promover a fixação do filme polimérico de PEI. As amostras foram colocadas em um pequeno reator, e após o fechamento foi feita aplicação do vácuo por três minutos, seguida da injeção de O₂ na câmara por três minutos, sendo mantido o oxigênio para o tratamento durante 20 min.

Após esta etapa, as amostras foram fixadas em lâminas de vidro com fita dupla-face para aplicação da técnica *dip coating*. Na figura 17 é possível observar o equipamento, LBL Nanostructure pro, utilizado e a disposição das soluções no equipamento, no departamento de Engenharia Química da Unicamp. Na imagem, da direita para a esquerda, podem ser visualizados o béquer contendo a solução PEI e os três béqueres de lavagem contendo solução

com ácido clorídrico diluído e pH 3, o mesmo pH das soluções de polimerização o para remover o excesso de monômero na superfície e do polímero fracamente aderido, sendo empregados tempos de imersão de 15 min, 2 min, 1 min e 1 min, respectivamente, durante este tempo as amostras permanecem em agitação dentro da solução.

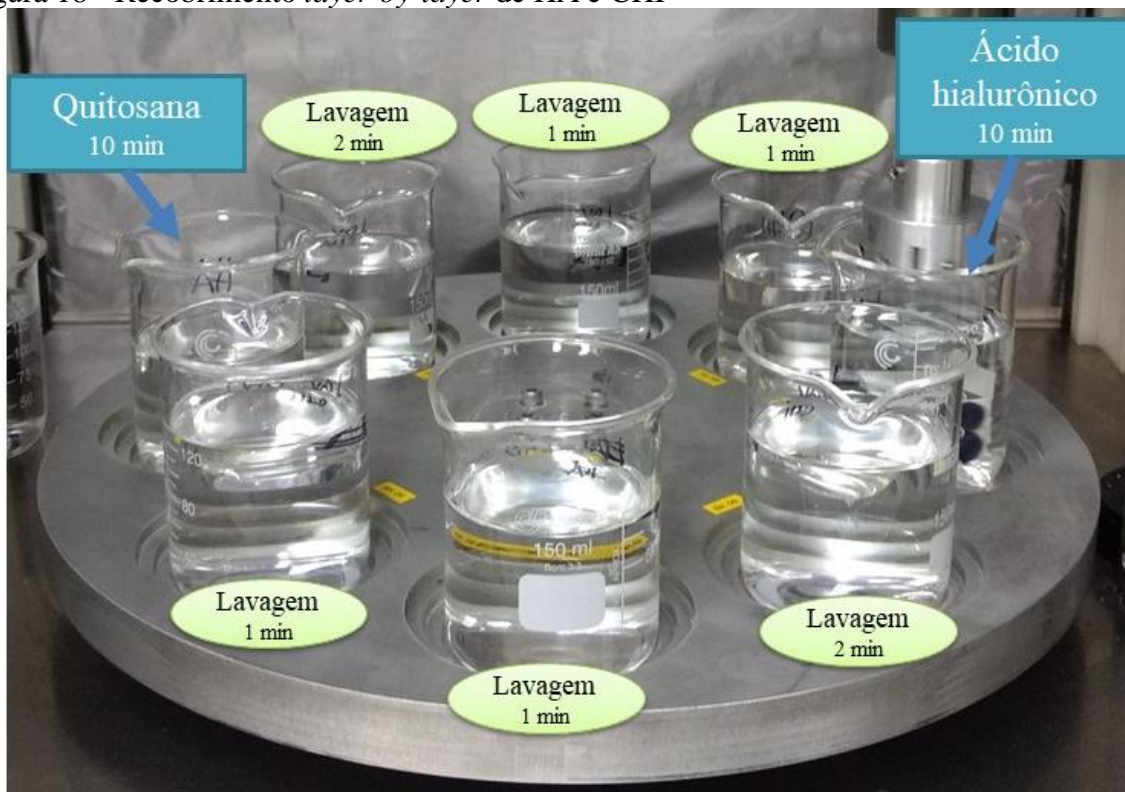
Figura 17 - Equipamento de recobrimento layer by layer com as soluções para o recobrimento polimérico de PEI



Fonte: Produção do autor

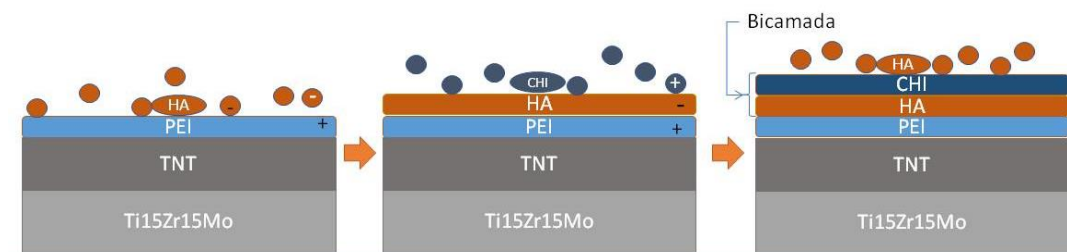
Após o recobrimento com PEI, conforme apresentado na Figura 18, as soluções do equipamento são trocadas pelas soluções utilizadas na deposição dos filmes poliméricos de ácido hialurônico e quitosana, a deposição do par de filmes é denominado "bicamada" representado na Figura 19. O mesmo procedimento adotado para o PEI foi empregado, na sequência, ou seja, imersão na solução de ácido hialurônico, seguida de lavagem, a imersão em quitosana, seguida de lavagem e reiniciando o ciclo até obter o número de bicamadas definido. Ao término do número de ciclos programados, as amostras foram retiradas do equipamento e posicionadas para secar ao ar. A quantidade ideal de bicamadas foi determinada a partir da aplicação da técnica sobre superfície dos nanotubos, variando o número de ciclos. Neste estudo, foram analisadas amostras com 2, 4 e 8 bicamadas.

Figura 18 - Recobrimento *layer-by-layer* de HA e CHI



Fonte: Produção do autor

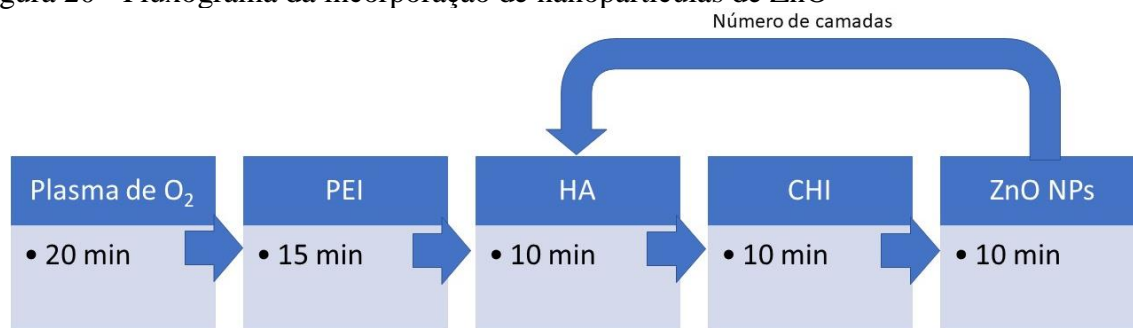
Figura 19 - Esquema da formação das bicamadas sobre as amostras



Fonte: Produção do autor

A incorporação de nanopartículas de óxido de zinco foi realizada um método semelhante ao da incorporação do filme polimérico com o acréscimo de um recipiente contendo as partículas de ZnO dispersas em solução ao ciclo de recobrimento, como mostrado no fluxograma na Figura 20.

Figura 20 - Fluxograma da incorporação de nanopartículas de ZnO

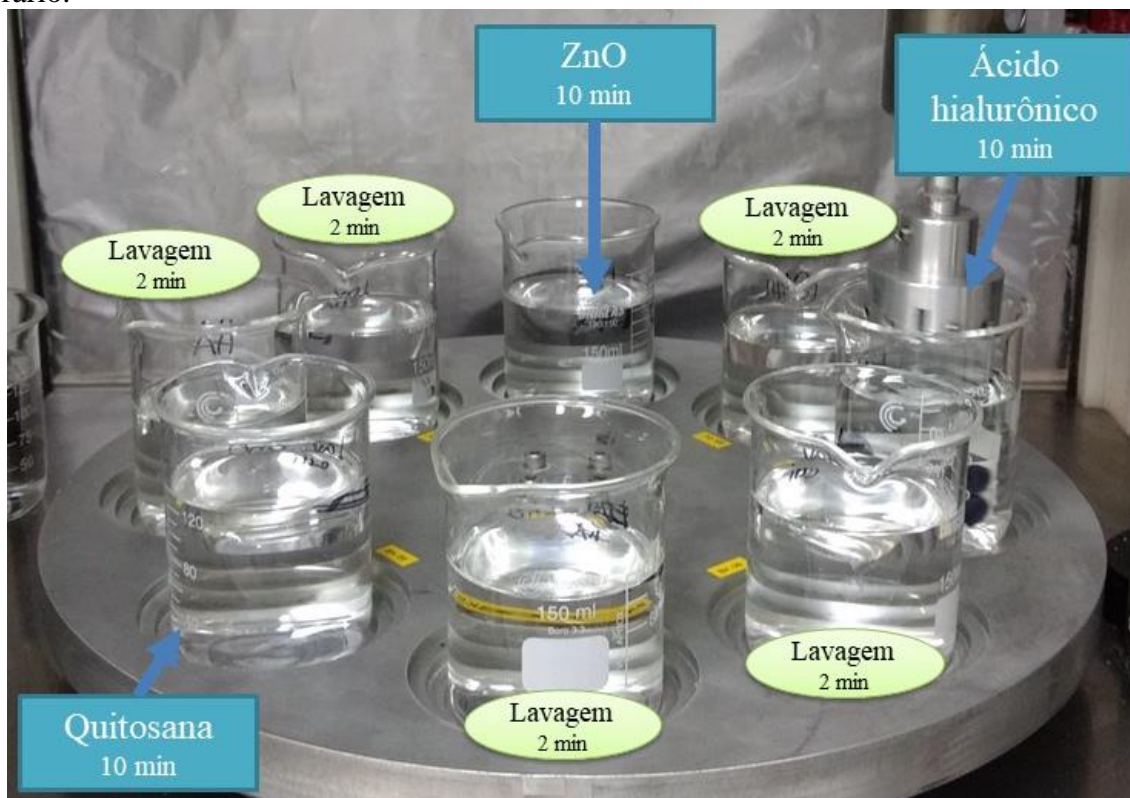


Fonte: Produção do autor.

A nova disposição (Figura 21) das soluções levou a remoção de duas soluções de lavagem e para compensar, elevou-se o tempo de uma das lavagens para dois minutos.

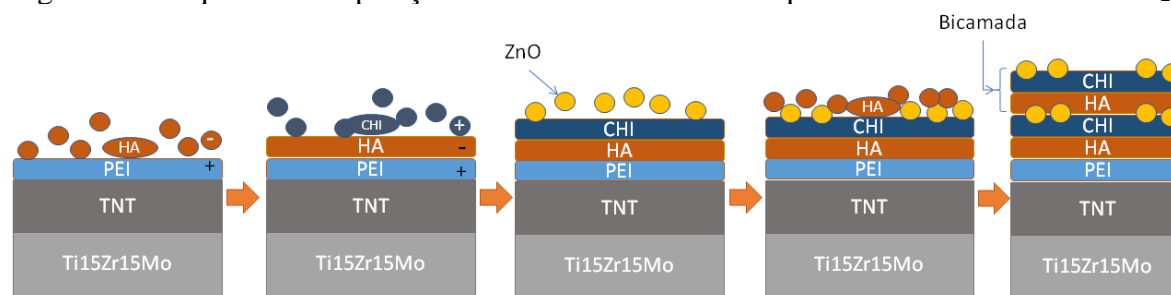
A solução de óxido de zinco foi preparada utilizando nanopartículas de óxido de zinco fornecido pelo professor Alexandre Zirpoli Simões (FEG/UNESP) pela dispersão das partículas em água ultrapura com pH 3, ajustado com HCl. Soluções com diferentes concentrações foram preparadas para o estudo (1 mM, 3 mM e 5 mM), com agitação até a completa dispersão. Após o revestimento sobre a superfície nanoestruturada, formou-se uma estrutura que se assemelha à um compósito (Figura 22).

Figura 21 - Equipamento de recobrimento *layer-by-layer* com as soluções de HA, CHI, ZnO e as soluções de lavagem posicionados na sequência de utilização, que será no sentido anti-horário.



Fonte: Produção do autor

Figura 22 - Esquema da deposição de filmes finos sobre a superfície de nanotubos de TiO₂.



Fonte: Produção do autor

O mesmo pré-tratamento nas amostras e utilizou a sequência das soluções no esquema foi utilizado nessa etapa.

A caracterização da superfície das amostras após tratamento de superfície foi realizada na universidade de Manitoba (Winnipeg - Canadá) durante o estágio supervisionado.

A análise da topografia foi realizada utilizando o Nova NanoSEM 450 da FEI, para isso, as amostras foram colocadas no suporte presa pela fita de carbono condutiva, uma da

amostra teve sua superfície riscada com auxílio de um estilete, para que fosse analisada a espessura do filme fino.

3.3.3 Medida do tamanho dos nanotubos

As medidas dos tamanhos dos nanotubos foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura Magellan 400L do laboratório de caracterização estrutural da UFSCar e o NovaNano SEM da FEI do Manitoba Institute for Materials (MIM) da University of Manitoba (UoM) - Canadá.

3.4 TAMANHO DE PARTÍCULAS DE ZnO

A análise do tamanho de partículas de ZnO foi realizada por meio duas técnicas: por meio da microscopia eletrônica de varredura e por espalhamento de luz dinâmico (DLS).

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o equipamento Novanano SEM no MIM/UoM, as imagens foram realizadas após aderir as partículas em uma fita condutiva de carbono e pela dispersão em isopropanol e pela deposição de algumas gotas sobre o suporte de análise, nos dois casos as amostras foram metalizadas. As imagens obtidas pela análise foram processadas utilizando o software ImageJ, com a finalidade de medir o tamanho de partículas.

Para a análise com o DLS, as partículas foram dispersas em isopropanol (100 mg/L) utilizando o banho ultrassônico para auxiliar na dispersão. A solução com as partículas dispersas foi analisada no Zetasizer Nano (Malvern Panalytical) do Instituto de Química da Unicamp.

3.5 ÂNGULO DE CONTATO

O ângulo de contato foi realizado no laboratório de Plasma e Aplicações do departamento de Física e Química da FEG/UNESP com equipamento goniômetro Ramé-Hart 300-F1. A análise foi realizada com gotas de 1 μ L de água deionizada.

3.6 ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (XPS)

Para análise da composição química da superfície da amostra, foram analisadas no Manitoba Institute for Materials (MIM), utilizando o espectrômetro de fotoelétrons excitados por raios-X Kratos Axis Ultra (Figura 23).

Figura 23 - Porta amostra preparado com as amostras para análise no XPS



Fonte: Produção do autor

O equipamento foi ajustado para realizar medidas em três regiões em cada amostra, e em cada região da amostra é realizado a análise em três diferentes profundidades gerada pela remoção de material por ablação com íons de argônio, utilizando tempos de: 0 segundos (superfície), 75 s (equivalente à 10 nm de profundidade) e 750 s (100 nm). Foi utilizado um filamento de alumínio (Al K α) monocromático e 150 W, varrendo a faixa de energia de ligação (*Binding Energy*) de 0 até 1200 eV. Foram definidos espectros de alta resolução para os elementos C 1s, O 1s, Ti 2p, Zr 3d, Zn 2p e Mo 3d.

3.7 PROLIFERAÇÃO BACTERIANA

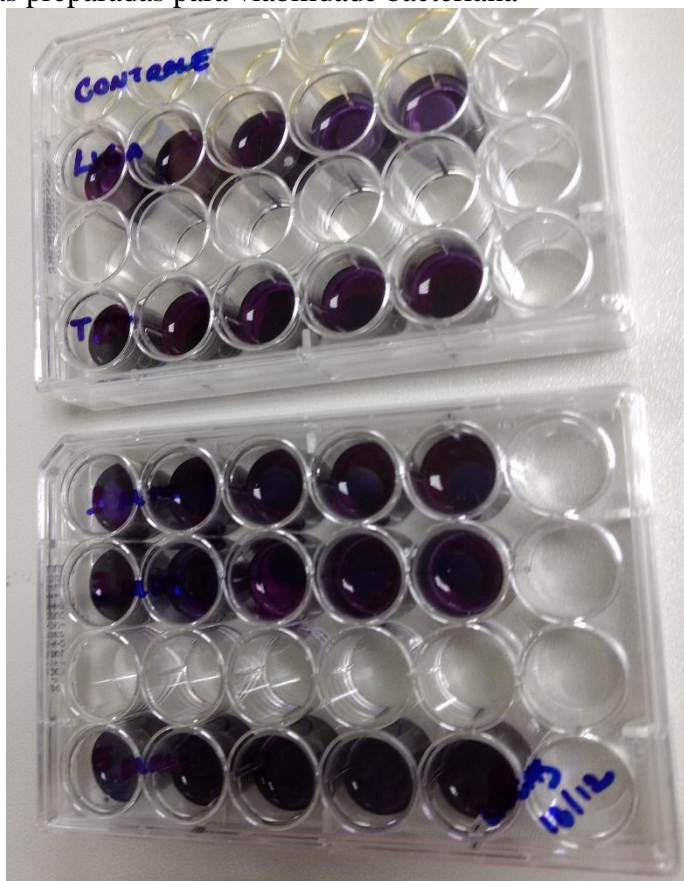
Essa etapa do trabalho foi realizada no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e tecnologia - ICT/UNESP.

Para análise de proliferação bacteriana sobre as amostras tratadas foram utilizadas a cepa de referências, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). As cepas de *S. aureus* são armazenadas em freezer a uma temperatura de -80 °C e para sua reativação, uma pequena alíquota do material congelado foi centrifugado junto com uma solução caldo de *Brain Heart Infusion* (BHI) e armazenado em uma estufa por 34 h a 37 °C. A suspensão foi semeada em Ágar Salgado (ágar + NaCl 0,75%) seletivo para *S. aureus*.

Uma suspensão padrão foi preparada pela diluição das colônias do micro-organismos foram diluídas em solução salina estéril 0,9%. Para medir a densidade óptica da solução padrão, foi utilizado o espectrofotômetro AJX-1900 (Micronal, São Paulo, Brasil) (Figura 24), utilizando filtro de 490 nm. A solução foi ajustada até obter o valor de 0,477 de densidade óptica, que equivale a 10^7 UFC/mL.

Os biofilmes foram cultivados placas de 24 poços. As amostras metálicas da liga com 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram posicionadas no fundo de cada poço. Juntamente com as amostras, foram distribuídos 500 μ L de suspensão microbiana padronizada e mais 500 μ L de BHI. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 h com uma troca do meio de cultura após 24 h.

Figura 24 - Amostras preparadas para viabilidade bacteriana



Fonte: Produção do autor

A atividade metabólica dos microrganismos foram avaliados pelo teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium), mensurando a atividade de enzimas presente nos microorganismos que convertem o sal de MTT em cristais de formazan,

Após 48 horas de incubação, foi determinado o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), para isso foi removido todo o caldo de BHI da placa de 24 poços, em seguida foi adicionado a cada poço uma solução (0,5 mg de MTT /mL de BHI). A placa foi incubada em uma estufa a 37 °C por 1 hora. Passado o tempo, foi removida a solução e adicionado etanol absoluto, para dissolver os cristais formados. A placa foi agitada por 10 min em um agitador e analisada em um equipamento de leitura de placa com comprimento de onda de 570 nm, a densidade ótica (DO) obtida foi convertida utilizando a fórmula:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado para indicar uma diferença estatisticamente significativa.

Para análise por MEV, as amostras de cada grupo, após 48 horas passaram pelo processo de fixação dos microrganismos, para isso foi removido os caldos dos respectivos poços e adicionado 500 μL de glutaraldeído a 2,5% por 40 min. Após esse tempo, foi removido e realizada uma sequência de trocas de soluções de álcool em diferentes concentrações: 25, 50, 75 e 100%. Nas soluções de 25, 50 e 75%, as soluções permaneceram por 5 min e na solução com 100%, permaneceu por 40 min, após este tempo o processo de fixação terminou e foi retirado o álcool presente nas placas para que ela fosse colocada em uma incubadora até a secagem total das peças.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse capítulo aborda os resultados obtidos a partir da modificação e funcionalização da superfície da liga Ti15Zr15Mo, estudo desenvolvido em parceria com a Unicamp e Univeristy of Manitoba

Inicialmente, são apresentados os resultados obtidos após a oxidação anódica da liga empregando diferentes parâmetros. Após a escolha da melhor condição são apresentadas as caracterizações após a funcionalização da superfície com filmes poliméricos contendo nanopartículas de ZnO.

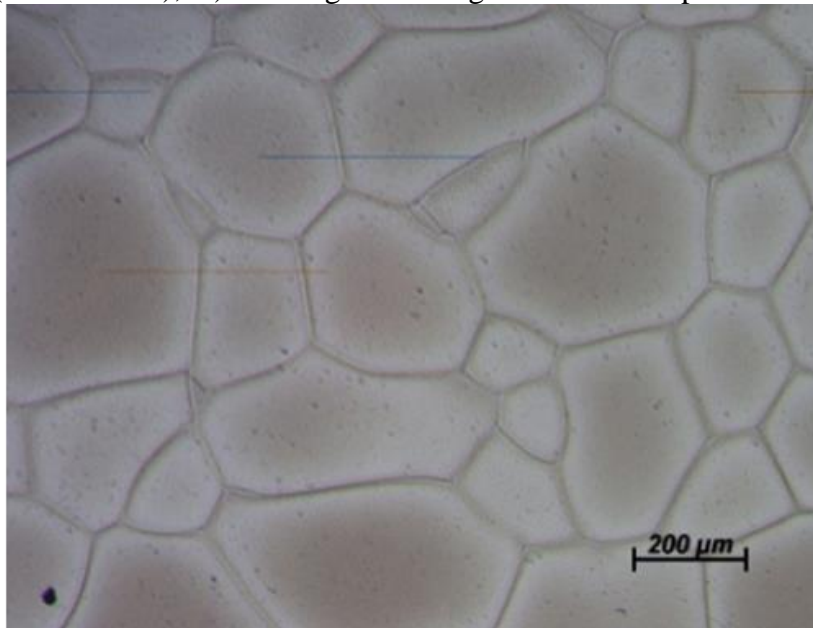
4.1 CARACTERÍSTICAS DA SUPERFÍCIE DA LIGA Ti15Zr15Mo APÓS OXIDAÇÃO ANÓDICA

Inicialmente foi realizada a microscopia óptica da liga para avaliar a microestrutura e as fases presentes. Na Figura 25 (a) é possível observar a microestrutura da liga Ti15Zr15Mo após fusão em forno a arco voltaico, forjamento a quente e tratamento térmico de solubilização (900 °C por 2 horas). Ela apresenta uma microestrutura com grãos equiaxiais característicos de ligas de titânio do tipo β . A presença dessa fase pode ser confirmada a partir da análise de difração de raios-X (Figura 25 (b)) com a presença da fase β indicada pelos picos em 38 °, 56 °, 70 ° (ZHU *et al.*, 2016)(HO; JU; LIN, 1999)(LAHEURTE *et al.*, 2010) e pela ficha ICSD 044391.

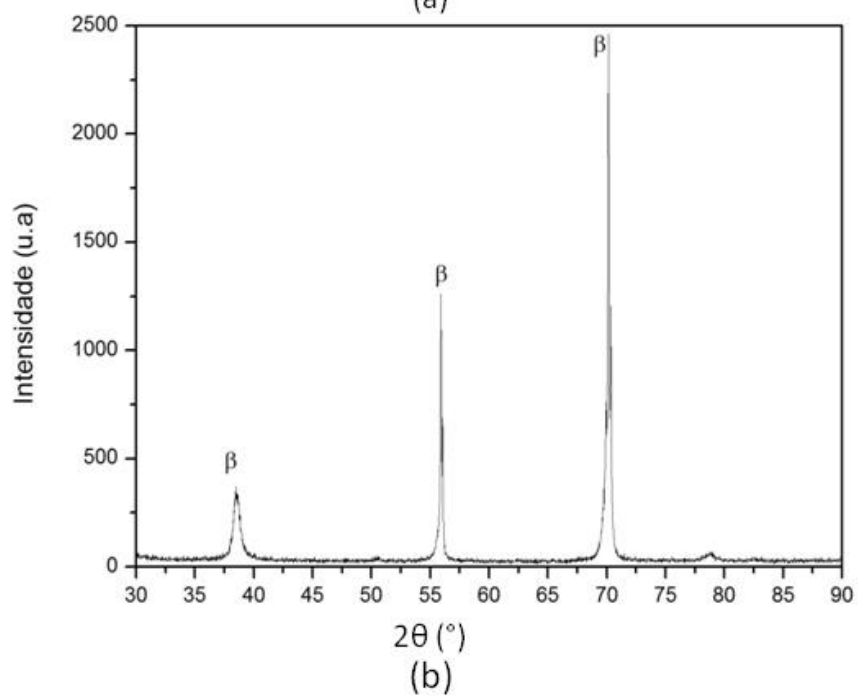
A presença da fase β na liga Ti15Zr15Mo também foi verificada em estudos realizados por Correa *et al.* (2014) mesmo empregando diferentes condições de processamento. A presença da fase β é atribuída a presença de molibdênio uma vez que a liga Ti15Zr apresenta microestrutura martensítica (anexo).

As ligas do tipo β apresentam propriedades de volume que tornam o seu uso interessante em aplicações biomédicas como por exemplo o baixo módulo de elasticidade. Dessa forma, o estudo da modificação de superfície dessa liga buscando a sua funcionalização foi avaliado.

Figura 25 - a) Micrografia da superfície da liga Ti15Zr15Mo obtida após fusão em forno a arco voltaico, tratamento térmico de homogeneização (1000 °C), forjamento a quente e solubilização (900 °C e 2 h); b) Difratoograma da liga Ti15Zr15Mo para as mesmas condições.



(a)



(b)

Fonte: Produção do autor

O processo de oxidação anódica foi escolhido e os parâmetros utilizados foram baseados em estudos realizados para as ligas binária Ti15Mo (RANGEL; ESCADA; ALVES CLARO, 2013) e Ti15Zr (anexo).

A formação de nanotubos de TiO₂ na superfície da liga Ti15Mo foi possível empregando eletrólito composto por glicerol, água deionizada (9:1 em volume) e NH₄F (2,5 g/L), potencial de 20V e tempo de 24 h. Para a liga Ti15Zr a mesma composição foi empregada para o eletrólito, porém em diferentes proporções ou seja 1:1 em volume, potencial de 20 V e variando o tempo de 6, 12 e 24 horas. Para as duas condições, a temperatura de calcinação escolhida foi 450 °C durante 1 h.

O aspecto da superfície da liga Ti15Zr15Mo após oxidação anódica (topo e seção transversal) empregando potencial de 20V, eletrólito glicerol, água (1:1 em volume) e NH₄F (2,7 g/L) e tempo de 6 h pode ser observado na Figura 26.

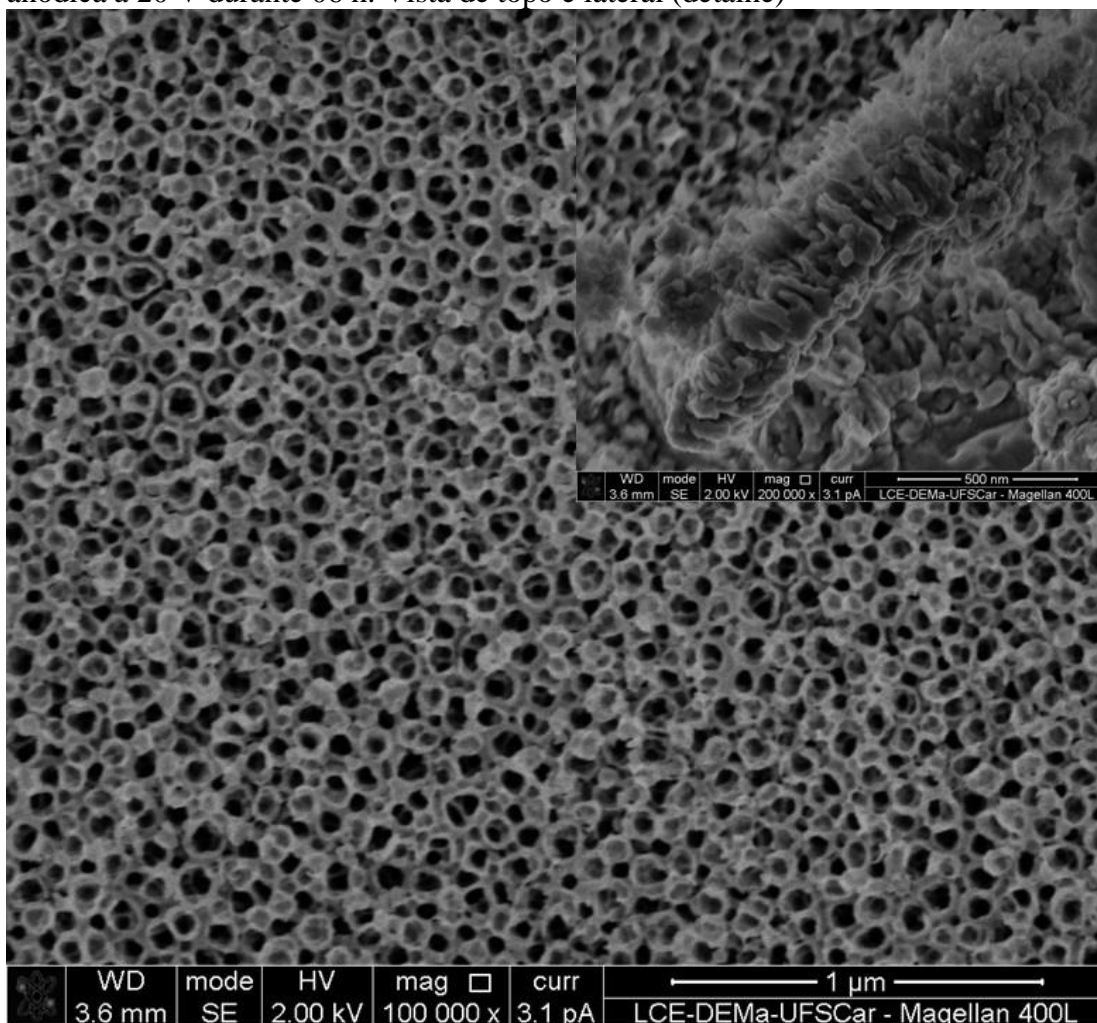
A formação dos nanotubos não foi verificada na seção transversal sendo, dessa forma, verificada a transição de uma superfície nanoporosa para nanotubular. O mecanismo de formação dos nanotubos de TiO₂ envolve as seguintes etapas: formação da camada de óxido, formação e aprofundamento dos poros, incorporação de pequenos poros adjacentes numa grande rede de poros, anterior a formação de matrizes de nanotubos, e formação de matrizes de nanotubos perfeitos (ZHAO *et al.*, 2005). A transição nanoporosa-nanotubular foi verificada por Kulkarni *et al.* (2015) para o Ti-CP a partir da variação dos parâmetros de anodização. Em nosso estudo, para potencial de 20 V e tempo de 6 h foram obtidos nanoporos com diâmetro de 67,3 nm.

Yasuda (2007) mostrou que a relação entre a potencial e o diâmetro médio na formação do nanotubos é uma curva linear, sendo que para a liga Ti50Zr quando utilizada uma solução de (NH₄)₂SO₄ e potencial de 20 V, os nanotubos obtidos apresentavam diâmetro médio de 100 nm, enquanto que para 80 V, os nanotubos apresentaram valores de diâmetro médio próximos a 350 nm. O valor da espessura aumentou até o potencial de 60 V, estabilizando a partir desse potencial em um valor aproximado de 20 µm. Interessante observar que no caso das ligas binárias para os mesmos parâmetros as dimensões do diâmetro e comprimento estarão sempre entre aquelas observadas para os elementos puros.

No nosso estudo, buscando encontrar os parâmetros que levassem a obtenção dos nanotubos de TiO₂, optou-se pela manutenção da tensão e eletrólito e aumento do tempo de

anodização uma vez que um potencial elevado tende a gerar uma dissolução permanente da camada de óxido e a formação dos nanotubos não ocorre para períodos curtos de anodização (MACAK; SCHMUKI, 2006; LI *et al.*, 2014; REGONINI; CLEMENS, 2015).

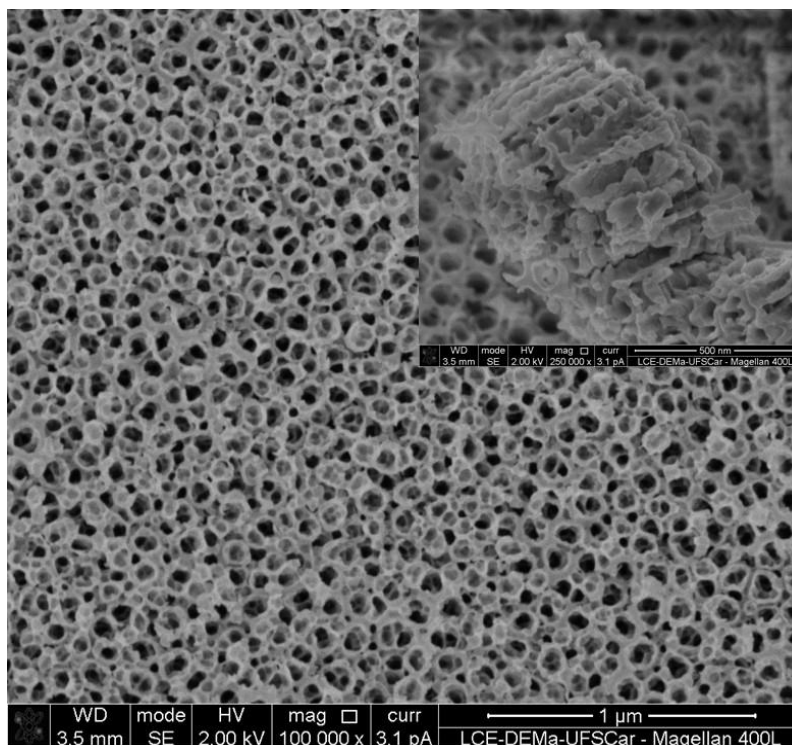
Figura 26 - Micrografia da superfície anodizada da liga Ti15Zr15Mo (MEV) após oxidação anódica a 20 V durante 06 h. Vista de topo e lateral (detalhe)



Fonte: Produção do autor

Apesar do emprego de tempo 24 h, potencial 20 V eletrólito glicerol e água deionizada (1:1 em volume) e fluoreto de amônio (2,7 g/L), não foi verificado a formação de nanotubos de TiO₂ na superfície da liga Ti15Zr15Mo, mas uma estrutura nanoporosa, como pode ser verificada na Figura 27. Para o tempo de 24 h houve um aumento significativo do diâmetro médio de 80,3 nm

Figura 27 - Micrografia da superfície anodizada da liga Ti15Zr15Mo (MEV) após oxidação anódica a 20 V durante 24 h. Vista de topo e lateral (detalhe)

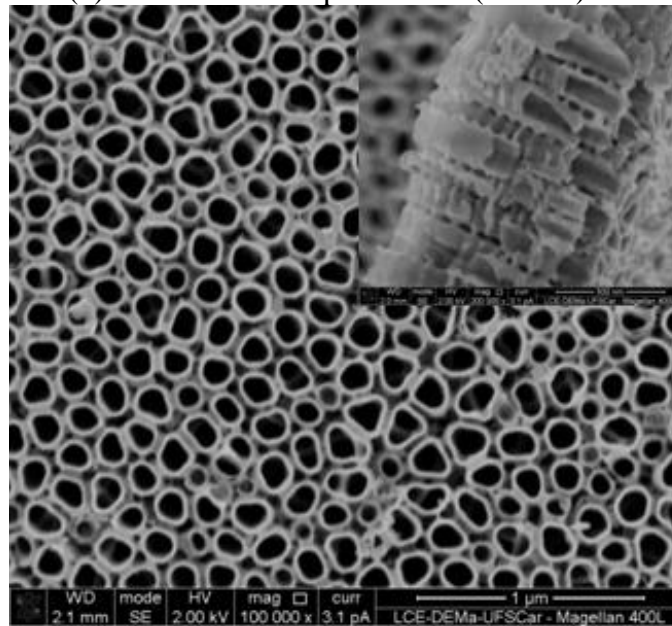


Fonte: Produção do autor

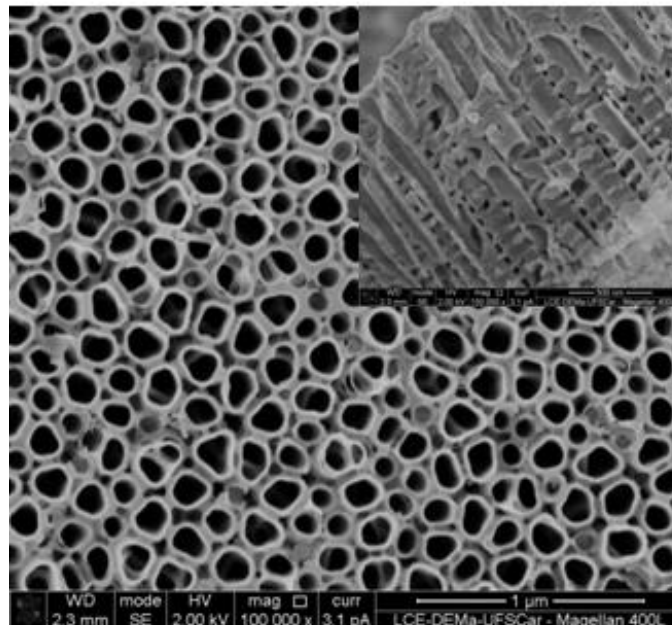
Como o aumento do tempo de anodização não foi suficiente para obtenção dos nanotubos, o potencial de anodização foi alterado de 20 V para 30 V. Os mesmos tempos empregados para 20 V foram novamente utilizados, ou seja, 6 e 24 h. Para essas condições nanotubos de TiO_2 foram obtidos com sucesso conforme pode ser verificado nas Figuras 28 (a) e (b).

Para o tempo de 6 h, os nanotubos apresentaram um diâmetro interno médio de 127,3 nm, espessura de parede de 26,6 nm e 755,2 nm de comprimento. A formação dos nanotubos de TiO_2 de forma homogênea e organizada foi observada.

Figura 28 - Micrografia da superfície anodizada da liga Ti15Zr15Mo (MEV) após oxidação anódica a 30 V, (a) 6 h e (b) 24 h. Vista de topo e lateral (detalhe)



(a)



(b)

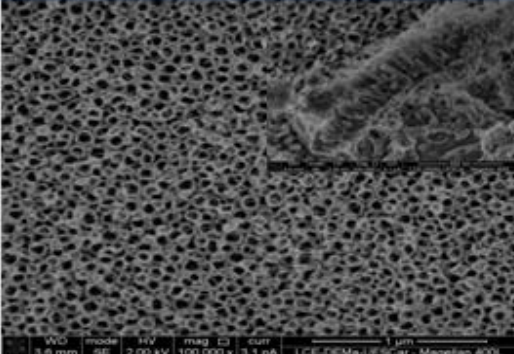
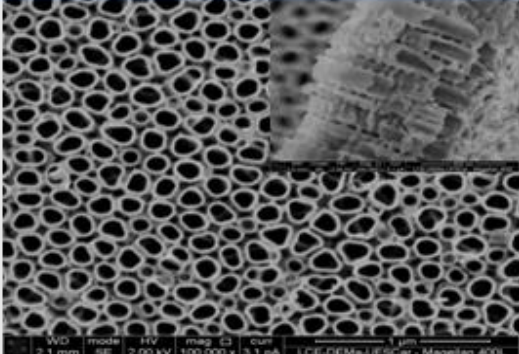
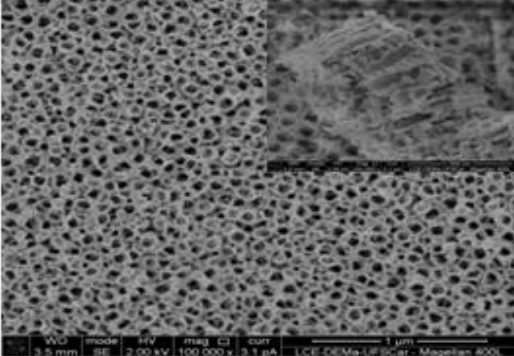
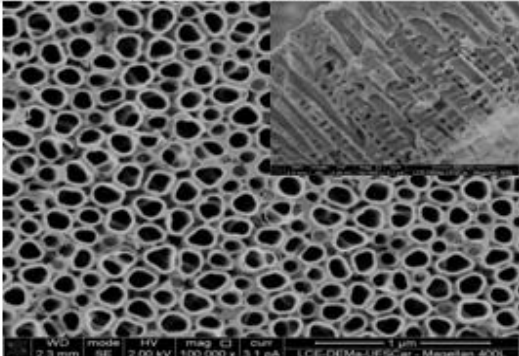
Fonte: Produção do autor

O grupo de amostras que foram anodizadas por 24 h, apresentaram diâmetro interno médio de 130,2 nm, 21,7 nm de parede e altura de 1290,4 nm. Para os tempos de 6 e 24 h a formação dos nanotubos mostrou-se homogênea por toda a superfície das amostras e com

nanotubos bem definido. Na Tabela 5 é possível observar o aspecto da superfície da liga Ti15Zr15Mo para todas as condições avaliadas.

A partir dos resultados obtidos, foi escolhida a condição 30 V, 24h e eletrólito formado por glicerol, água deionizada (1:1 em volume) e NH₄F (2,7 g/L). A escolha foi baseada no valor do diâmetro médio (130 nm) o qual de acordo com a nossa teoria deveria possuir um valor que permitisse posteriormente o recobrimento da superfície com o revestimento polimérico sem o fechamento dos tubos.

Tabela 5 - Comparativo entre os resultados obtidos com o tratamento de superfícies nas diferentes condições de oxidação anódica.

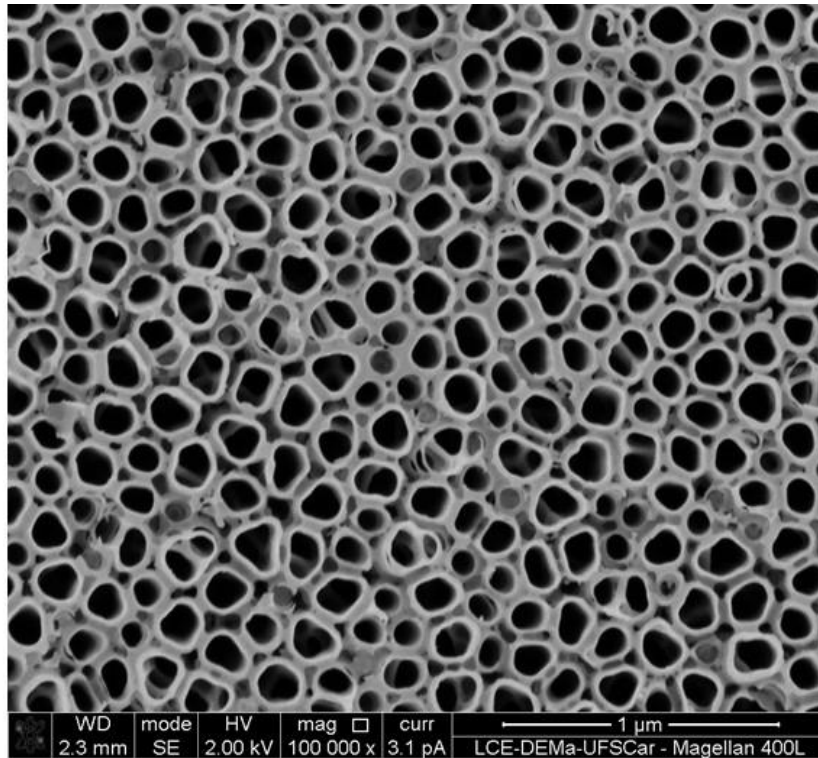
	20V	30V
6h	 <p>Diâmetro: 67,3 nm Comprimento: 340,0 nm</p>	 <p>Diâmetro: 127,3 nm Comprimento: 755,2 nm</p>
24h	 <p>Diâmetro: 80,3 nm Comprimento: 355,5 nm</p>	 <p>Diâmetro: 130,2 nm Comprimento: 1294,0 nm</p>

Fonte: Produção do autor

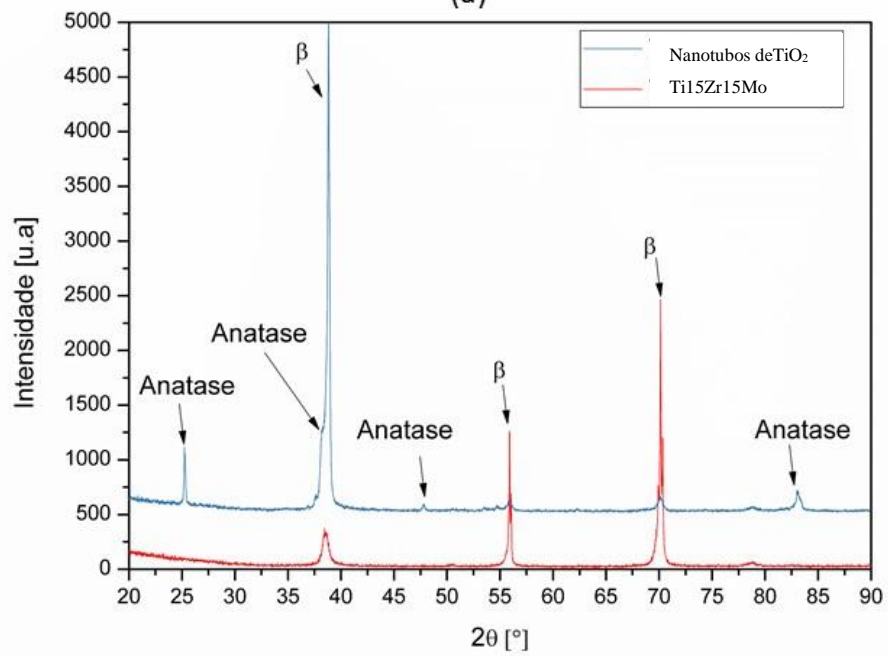
A estrutura e a composição química da superfície para os parâmetros de anodização escolhidos (30V, 24h, eletrólito glicerol, água DI (1:1 em volume) e NH_4F (2,7 g/L)) e calcinação a 450 °C foram avaliadas empregando difração de raios-X (DRX) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

Na Figura 29 (a) é possível observar a micrografia da superfície analisada e o difratograma os picos correspondentes à fase anatase (ICSD 082080) e a fase β da liga Figura 29 (b). A camada de titânio amorfa resultante da oxidação anódica pode assumir a forma cristalina de anatase, rutilo e brookita para diferentes temperaturas e tempos (CHAVES, 2016; SHIVARAM, 2014; FANG, 2011). Estudos tem reportado que para aplicações biomédicas a presença da fase anatase facilita o crescimento da hidroxiapatita, aumentando dessa forma a proliferação celular.

Figura 29 - (a) Microscopia da superfície de nanotubos de TiO_2 crescidos sobre a liga Ti15Zr15Mo, utilizando 30 V, durante 24 h, e calcinado a 450 °C. (b) Difração de raios-X da superfície analisada



(a)



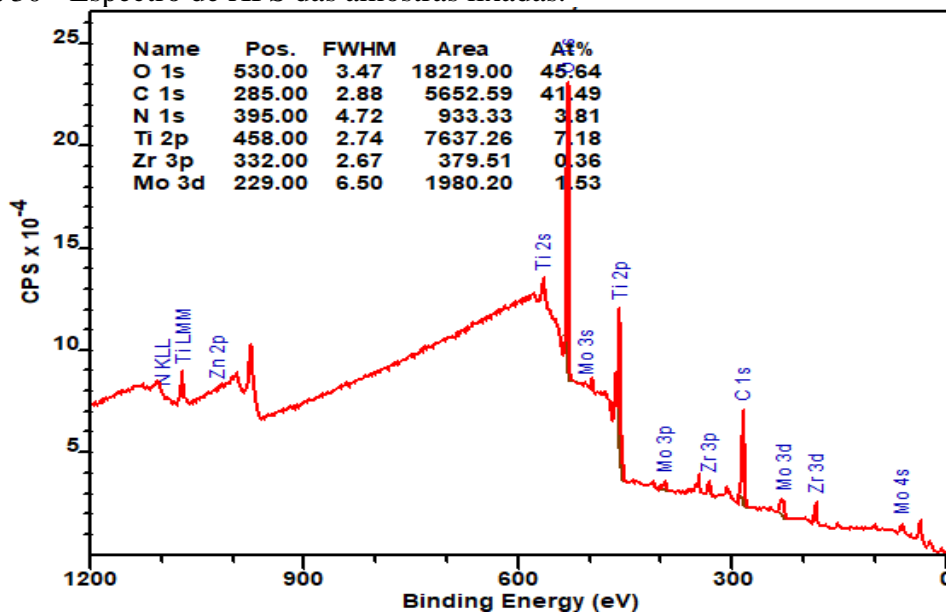
(b)

Fonte: Produção do autor.

4.1.1 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X

A análise da composição química foi realizada por XPS para a liga antes e após o crescimento de nanotubos de TiO₂. O espectro de varredura da superfície da amostra sem tratamento, revelando a composição química da superfície da liga é apresentada na Figura 30. O gráfico apresenta os valores em porcentagem atômica dos elementos presentes na superfície da camada passiva. Os elementos identificados pelos picos referente aos elementos oxigênio, carbono, titânio, zircônio e molibdênio. Na *Tabela 6* está disposta a proporção atômica de cada elemento presente em três camadas analisadas: superfície, 10 nm de profundidade e 100 nm de profundidade realizados pela remoção de camadas utilizando plasma de argônio.

Figura 30 - Espectro de XPS das amostras lixadas.



Fonte: Produção do autor.

A análise quantitativa dos elementos presente na superfície revelou que ela apresenta 17 %at. de Ti, 0,98 %at. de Zr, 3,17 %at. de Mo e 42,52 %at de O, elementos que estão relacionados a composição da liga, porém em teores menores do que o esperado, fato relacionado ao maior teor de carbono na superfície, que está relacionado aos grupos orgânicos atribuídos à contaminações da superfície. O *etching* de 10 nm foi realizado para remover as possíveis contaminações da superfície, revelando a composição da superfície do material, sem contaminações, mostrando que a concentração dos elementos presente na superfície é predominantemente composta por titânio (38 %at) e oxigênio (26 %at). O titânio, molibdênio e o zircônio aparecem em

proporções diferentes das esperadas dela composição resultante da formação de óxidos complexos de $ZrTiO_4$, $Zr_5Ti_7O_{24}$, $ZrTi_2O_6$ (YASUDA; SCHMUKI, 2007) e TiO_2-MoO_3 (AGARWAL *et al.*, 2010).

Tabela 6 - Composição de elementos presente na superfície em três camadas de profundidade.

Tempo de <i>etching</i>	C 1s (%at)	O 1s (%at)	Ti 2p (%at)	Zr 3p (%at)	Mo 3d (%at)
0	36,21	42,52	17,12	0,98	3,17
75	23,05	26,89	38,64	2,90	8,52
750	18,75	18,05	47,84	4,19	11,17

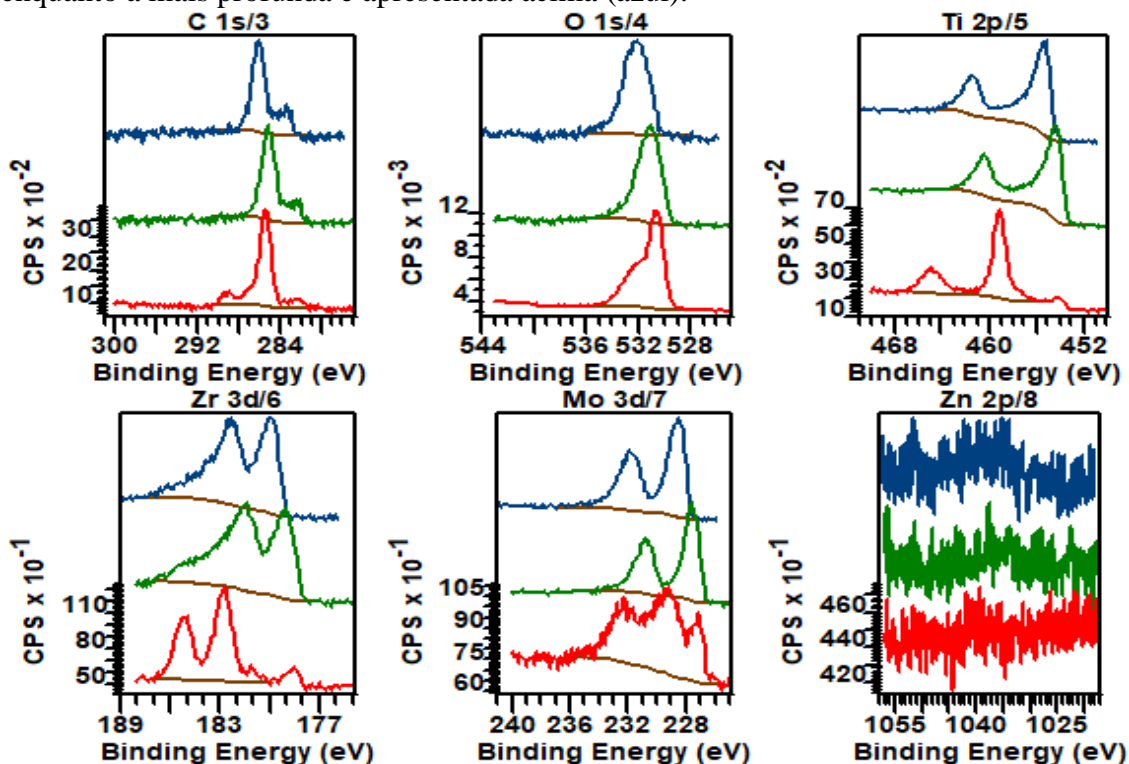
Fonte: Produção do autor

Os espectros de alta resolução dos elementos carbono, oxigênio, titânio, zircônio, molibdênio e zinco estão apresentados na Figura 31. Para cada gráfico, foi realizado a sobreposição das curvas realizadas na superfície, 10 e 100 nm de *etching* (de baixo para cima). Elas mostram o estado de oxidação de cada elemento. Os elementos carbono e oxigênio ficam mais eletropositivo (a energia de ligação aumenta) conforme a superfície sofre a remoção por ablação enquanto os metais (Ti, Zr e Mo) tendem a ficar mais eletronegativos.

As atribuições dos picos obtido pela análise de ajuste de picos dos espectros de alta resolução dos elementos C, O, Ti, Zr e Mo estão apresentados nas Tabela 7 a 8 (respectivamente). Os picos do espectro de alta resolução do C 1s (Tabela 7) foram atribuídos à C-C, C-H (DELPEUX *et al.*, 1998), H-COOH (DAVIES; ROBERTS; SHUKLA, 1991), CO (FRYBERGER; GRANT; STAIR, 1987) C-OH, C-O-C, C-N e C-NH₂ (WIERTZ; BERTRAND, 1998). A concentração de cada grupo varia conforme o *etching* é realizado, mostrando que em cada nível há uma variação na formação dos grupos presente.

Para o espectro de alta resolução do oxigênio, os picos foram atribuídos TiO_2 (ESTRADE-SZWARCKOPF *et al.*, 1998), hidróxidos (PILLEUX; GRAHMANN; FUENZALIDA, 1994), $TiNO$ (KUZNETSOV; ZHURAVLEV; GUBANOV, 1992), C=O, C-O-C, C-OH e O e/ou H_2O absorvido (GARDNER *et al.*, 1995).

Figura 31 - Espectro de alta resolução do C, O, Ti, Zr, Mo e Zn da amostra sem tratamento de superfície. A análise feita na superfície é apresentada abaixo (vermelho) enquanto a mais profunda é apresentada acima (azul).



Fonte: Produção do autor

O espectro de alta resolução dos metais mostraram presença dos metais nas formas: Ti metálico (CALLEN *et al.*, 1995), TiO₂ (BOULMER-LEBORGNE *et al.*, 1992), Ti-OH (SODHI *et al.*, 1991), subóxido de Ti (PERRY *et al.*, 1993) (PARAMASIVAM *et al.*, 2012), TiNO (HOFMANN, 1991), Zr, Zr(OH)₄ (BARR, 1978), ZrO₂ (BENSCH *et al.*, 1995), ZrF₄ (HOFMANN, 1986), Mo metálico (SEAH, 1993) e MoO₂ (CHASTAIN; KING; MOULDER, 1992). No titânio, a presença de TiO₂ é maior na superfície, enquanto que após o primeiro *etching* sua concentração cai de 58% para 12%, enquanto o Ti metálico aumenta de 13% para 48%, mostrando que após o primeiro *etching* foi removido parte das primeiras camadas referente ao óxido, chegando mais próximo do substrato. Após o segundo *etching* há um maior destaque para a presença de subóxido de titânio e dióxido de titânio.

Tabela 7 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do C 1s realizado na amostra sem tratamento de superfície.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
282,3	H-COOH	10,23%	8,66%	6,80%
283,4	CO, C ₃ H ₆	7,90%	7,94%	8,54%
284,7	C-C, C-H	47,26%	56,56%	34,54%
286,7	C-OH, C-O-C, C-N, C-NH ₂	34,61%	26,85%	50,12%

Fonte: Produção do autor

Tabela 8 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do O 1s realizado na amostra sem tratamento de superfície.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
530,8	TiO ₂	57,82%	38,15%	23,80%
531,7	Hidróxido	16,67%	20,14%	0,00%
531,8	TiNO	6,33%	13,00%	21,00%
532,5	C=O	11,71%	17,70%	30,92%
534,0	C-O-C, C-OH	7,46%	11,01%	22,62%
535,8	O e/ou H ₂ O absorvido	0,00%	0,00%	1,65%

Fonte: Produção do autor

A concentração do Zr na forma de metal aumenta de 32 para 82% entre a superfície e a profundidade de 100 nm, enquanto a concentração de ZrO₂ decai de 55% para 10 % na mesma condição, mostrando que existe um gradiente na concentração de óxido. A presença do molibdênio na camada de óxido mostra que ela é formada por partes do molibdênio metálico e do dióxido de molibdênio.

Tabela 9 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Ti 2p realizado na amostra sem tratamento de superfície..

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
454,5	Ti metal	13,86%	48,49%	35,09%
458,3	TiO ₂	58,57%	12,62%	18,13%
457,9	Ti-OH	3,23%	2,18%	0,00%
455,9	Ti Subóxido	16,66%	28,93%	40,17%
455,2	TiNO	7,67%	7,79%	6,61%

Fonte: Produção do autor

Tabela 10 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zr 2p realizado na amostra sem tratamento de superfície.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
180,3	Zr Metal	32,31%	79,09%	82,39%
182,5	ZrO ₂	55,17%	15,61%	10,72%
183,5	Zr(OH) ₄	12,52%	5,31%	4,94%
184,7	ZrF ₄	0,00%	0,00%	1,94%

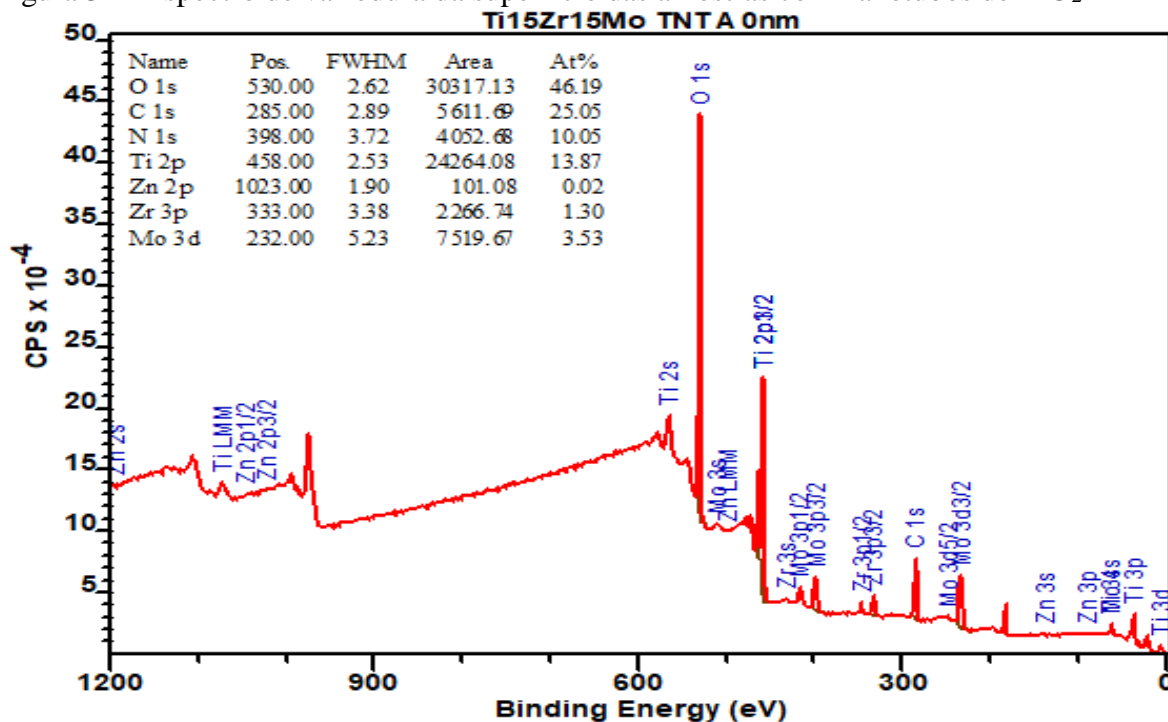
Fonte: Produção do autor

Tabela 11- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Mo 3d realizado na amostra sem tratamento de superfície.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
227,9	Mo metálico	55,06%	75,60%	47,94%
229,7	MoO ₂	44,94%	24,40%	52,06%

Fonte: Produção do autor

A composição química da superfície das amostras com nanotubos crescidos foram analisadas pela espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X. O espectro da superfície com os elementos identificados está na Figura 32. As análises foram realizadas em três camadas diferente, obtidos pela remoção de camadas atômicas realizada pelo *etching* com diferentes tempos (0, 75 e 750 segundos), a composição da superfície e estão na Tabela 12, composição relativa dos elementos presente na área analisada.

Figura 32 - Espectro de varredura da superfície das amostras com nanotubos de TiO₂

Fonte: Produção do autor

Tabela 12 - Composição dos elementos presente na superfície de nanotubos crescido sobre a liga Ti15Zr15Mo.

TNT	O 1s	C 1s	N 1s	Ti 2p	Zn 2p	Zr 3p	Mo 3d
0	45,34	26,21	9,80	13,97	0,02	1,28	3,39
75	51,99	4,53	16,49	20,49	0,00	2,16	4,34
750	46,31	3,49	21,43	21,61	0,00	2,42	4,74

Fonte: Produção do autor

O espectro de alta resolução dos elementos C, O, Ti, Zr, Mo foram analisados utilizando o software Casa para realizar a decomposição da curva e associar os picos referente aos tipos de ligações entre elementos. As atribuições dos picos resultante foram comparados aos bancos de dados contendo estudos realizados por outros autores que associaram os níveis de energia de ligação aos tipos de ligações atribuídos aos picos da deconvolução conforme nas Tabela 13 à Tabela 17.

Tabela 13 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do C 1s realizado na amostra recobertas com a superfície de nanotubos de TiO₂.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
282,6	Carbeto	0,00%	0,79%	0,98%
286,6	COH, COC, CN, CNH ₂	24,59%	14,12%	2,86%
285,0	C-C, C-H, C-O	75,41%	85,09%	96,16%

Fonte: Produção do autor

Tabela 14- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do O 1s realizado na amostra recobertas com a superfície de nanotubos de TiO₂.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
531,3	Hidróxido	0,00%	0,00%	3,70%
530,6	TiO ₂	91,94%	87,18%	78,72%
532,7	C=O	1,98%	3,24%	4,85%
533,7	C-O-C, C-OH	0,00%	0,00%	0,62%
531,8	TiNO	6,08%	9,58%	12,12%

Fonte: Produção do autor

Tabela 15 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Ti 2p realizado na amostra recobertas com a superfície de nanotubos de TiO₂.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
459,0	TiO ₂	100,00%	87,63%	60,47%
457,9	Ti-OH	0,00%	0,00%	5,68%
456,0	Ti Subóxido	0,00%	12,37%	28,03%
455,1	TiNO	0,00%	0,00%	5,82%

Fonte: Produção do autor

Tabela 16 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zr 2p realizado na amostra recobertas com a superfície de nanotubos de TiO₂.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
181,1	Zr	0,00%	0,00%	20,53%
183,4	Zr(OH) ₄	0,00%	9,16%	0,00%
182,9	ZrO ₂	100,00%	90,84%	79,47%

Fonte: Produção do autor

Tabela 17 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Mo 3d realizado na amostra recobertas com a superfície de nanotubos de TiO₂.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
228,5	Mo	0,00%	27,98%	16,97%
230,4	MoO ₂	32,50%	52,85%	72,95%
232,7	MoO ₃	67,50%	19,17%	10,07%

Fonte: Produção do autor

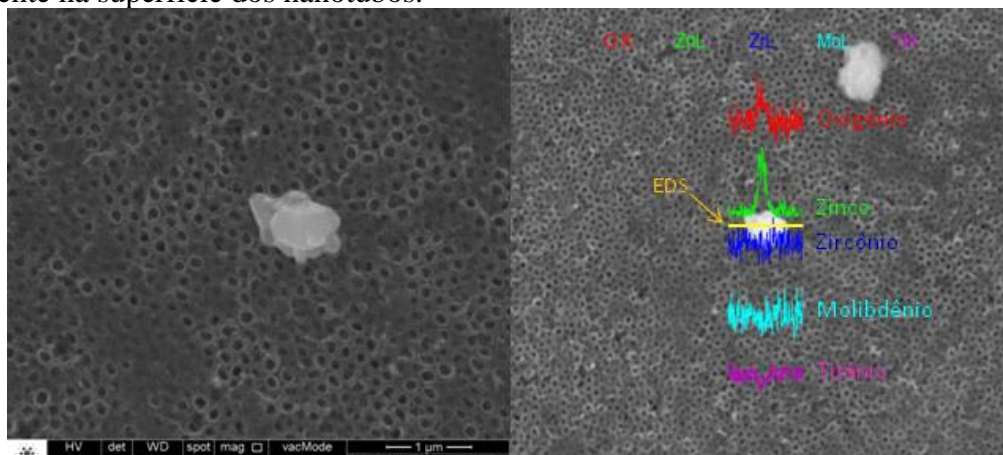
4.2 FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

A superfície da liga Ti₁₅Zr₁₅Mo foi funcionalizada empregando a técnica *layer-by-layer* (LBL) utilizando bicamadas de ácido hialurônico e quitosana empregadas

como revestimento bactericida. A técnica foi preconizada por (HERNÁNDEZ-MONTELONGO et al., 2016a) e (MARTINS *et al.*, 2015) para a produção de filmes poliméricos. O objetivo foi empregar essa técnica na superfície contendo os nanotubos de TiO_2 para a obtenção de revestimentos bactericidas.

A superfície da liga após o recobrimento com polímero contendo partículas de ZnO pode ser observada na Figura 33. Nesse caso, as partículas de ZnO tenderam a se aglomerar na superfície, comprovada pela análise por espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS). Foi traçada uma reta sobre a partícula, aonde foram analisadas a presença dos elementos: oxigênio (vermelho), zinco (verde), zircônio (azul), titânio (azul claro) e molibdênio (violeta). O resultado mostrou que a partícula apresentou os elementos: oxigênio e zinco, comprovando ser uma das partículas de óxido de zinco e não uma partícula de polímero.

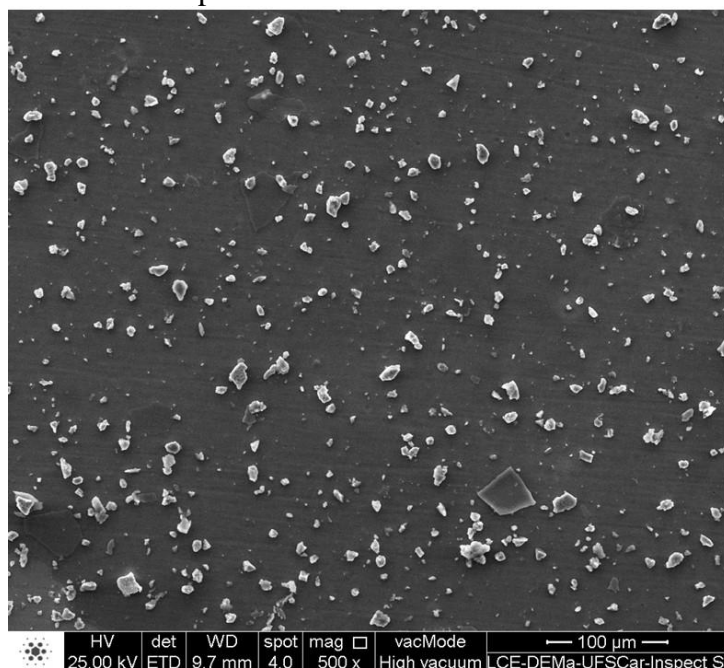
Figura 33 - Mev dos nanotubos de TiO_2 crescido na superfície da liga $\text{Ti}_{15}\text{Zr}_{15}\text{Mo}$ recobertos com 2 bicamadas de [HA/CHI/ZnO]. A) imagem da partícula, B) análise da composição química por EDS da partícula, identificando a intensidade de cada elemento presente na superfície dos nanotubos.



Fonte: Produção do autor

As amostras que foram recobertas utilizando quatro ou oito bicamadas não apresentaram os nanotubos evidentes e um número grande de partículas geradas pela polimerização como pode ser observado na Figura 34 (oito bicamadas).

Figura 34 - Mev dos nanotubos de TiO₂ crescido na superfície da liga Ti15Zr15Mo recobertos com 8 bicamadas de [HA/CHI/ZnO]. A camada apresenta um número grande de partículas poliméricas na superfície



Fonte: Produção do autor

4.2.1 Ângulo de contato

As amostras com nanotubos apresentam uma superfície superhidrofílica, e a funcionalização da superfície altera as propriedades de superfície, alterando a molhabilidade. Podemos ver na Tabela 18 a variação do ângulo de contato em função do número de bicamadas empregados no recobrimento dos nanotubos. Conforme o número de bicamadas aumenta, o ângulo de contato aumenta.

Tabela 18 - ângulo de contato e do número de bicamadas das amostras com e sem nanopartículas.

Número de bicamadas	2 (°)	4 (°)	8 (°)
Sem ZnO	12,75	36,71	22,46
Com ZnO	10,3	46,73	28,52

Fonte: Produção do autor

O processo de oxidação anódica criou uma superfície nanoestruturada, que é propícia para o desenvolvimento de algumas células como visto em resultados de trabalhos como de Capellato *et al.* (2012) que criou uma superfície de nanotubos e observou que a proliferação de fibroblastos foi maior na superfície nanoestruturada do que na superfície lixada. A deposição do filme polimérico sobre a superfície de

nanotubos não deve recobrir totalmente ao ponto de fechar os nanotubos, tornando a superfície plana.

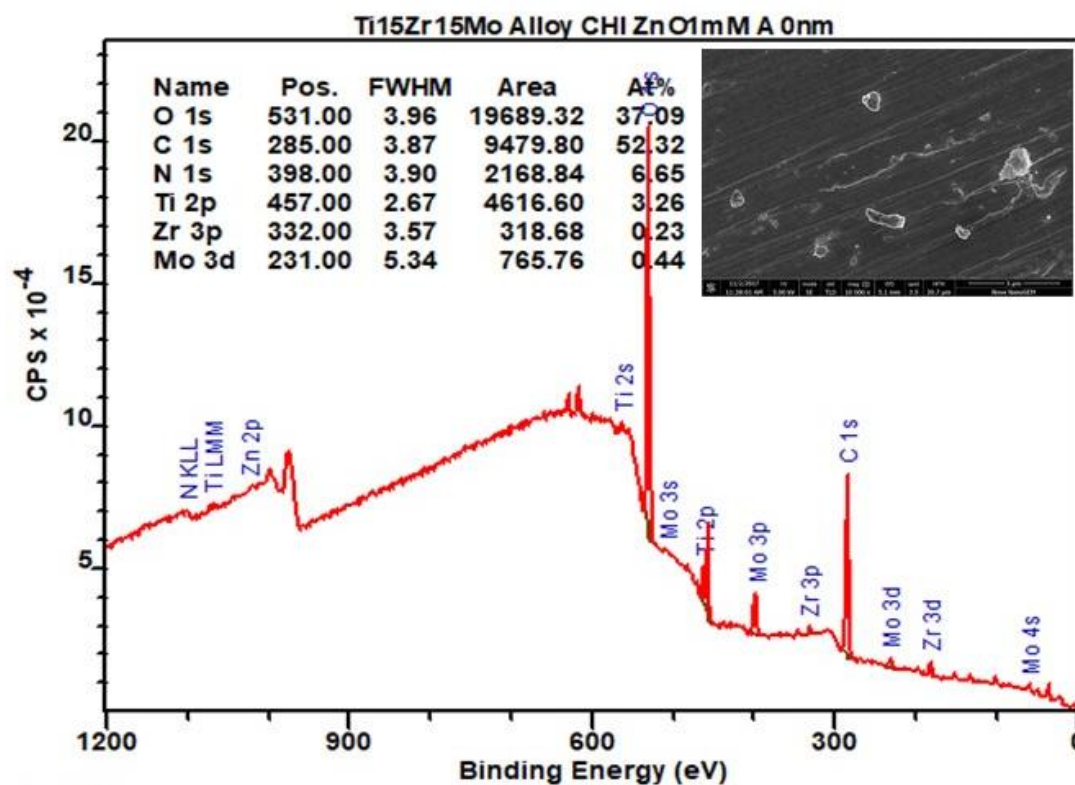
Em vista dos resultados obtidos pela microscopia eletrônica de varredura e pelo ângulo de contato e energia de superfície, foi escolhido a condição com duas bicamadas, por apresentar o recobrimento parcial dos nanotubos (não fechamento dos nanotubos), incorporado as partículas e por apresentar um resultado de baixa molhabilidade.

4.3 ESTUDO DA INFLUENCIA DA CONCENTRAÇÃO NA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTICULAS

A partir da escolha do número de bicamadas ideal para a formação do revestimento polimérico, um outro fator avaliado foi a concentração de ZnO que levaria aos melhores resultados com relação a atividade bactericida do filme, foram estudados valores diferentes para as concentrações da solução de incorporação das nanopartículas (1, 3 e 5 mM).

A superfície da amostra da liga sem nanotubos funcionalizada utilizando concentração de 1 mM é apresentado no detalhe da Figura 35, nela pode-se observar a superfície da liga lixada, e partículas do polímero que formaram glóbulos que ficaram aderidas ao filme polimérico.

Figura 35 - Espectro Survey da liga lixada funcionalizada com 2 bicamadas e solução de ZnO 1mM e detalhe da superfície analisada.



Fonte: Produção do autor

A composição química da superfície da amostra lixada e recoberta com o polímero foi analisada por XPS. Os elementos presentes na superfície da amostra foram resumidos na Tabela 19, podemos ver a concentração atômica dos elementos presentes em função das camadas analisadas. A concentração do carbono decai em função do tempo de etching, o oxigênio tem uma redução no seu valor e enquanto os metais tendem a aumentar a concentração em função do tempo de etching.

A partir da Tabela 20 até a 24, estão apresentadas as atribuições aos picos resultante da deconvolução do espectro de alta resolução dos elementos carbono, oxigênio, titânio, zircônio e molibdênio.

Podemos ver na Tabela 20 os resultados das deconvolução das curvas de alta resolução do carbono presente na superfície da amostra que são atribuídos aos grupos C-N e ao C-H na superfície da amostra. Após o primeiro *etching*, há uma presença maior do carbono na forma C=O e C=N, enquanto que depois do segundo *etching* há predominância dos grupos C=O e O-C-C. O oxigênio apresenta sinal para óxido de titânio, enquanto após o *etching* os grupos orgânicos (C-O-C e C-OH) estão mais evidentes.

Os metais Ti, Zr e Mo estão apresentados nas Tabela 22, 23 e 24 (respectivamente) o Zn não apresentou quantidade mínima necessária para ser analisada. O titânio apresentou o pico atribuídos ao TiO_2 como o principal estado do titânio nas três camadas analisadas (superfície, 75 e 750 s de *etching*), mostrando que o titânio está predominantemente na forma de dióxido de titânio. O Zr teve picos atribuídos ao dióxido de zircônio e ao zircônio metálico em maior quantidade em sua superfície e para o oxifluoreto de zircônio após o *etching* e ao hidróxido de zircônio após o segundo *etching*. O Mo apresentou formação de dióxido de molibdênio e trióxido de molibdênio na sua superfície e após os *etching* só apresentou o MoO_3 .

Tabela 19 - Tabela com a concentração de elementos presente na superfície recoberta com biopolímero e ZnO e em diferentes profundidades de análise.

Tempo de <i>etching</i>	C 1s	O 1s	N 1s	Ti 2p	Zr 3p	Mo 3d
0	32,56%	44,69%	5,60%	13,77%	1,32%	2,06%
75	10,50%	43,71%	4,33%	28,42%	3,15%	9,88%
750	7,56%	26,65%	1,57%	40,35%	4,80%	19,06%

Fonte: Produção do autor

Tabela 20 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do C 1s realizado na amostra sem tratamento de superfície.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
277,3	CH ₄	0,00%	0,00%	33,28%
282,7	Carbeto	6,78%	0,00%	0,00%
284,7	C-C, C-H	0,00%	0,00%	23,74%
284,8	C-H	37,53%	0,00%	0,00%
284,8	C-O	8,74%	0,00%	0,00%
285,7	C-N	40,50%	35,15%	0,02%
287,1	C=N	5,93%	0,00%	0,00%
287,6	-C=O- ou -O-C-O-	0,00%	0,00%	42,93%
288,3	C=O, C=N	0,00%	64,85%	0,00%
288,5	COOH	0,53%	0,00%	0,03%

Fonte: Produção do autor

Tabela 21- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do O 1s realizado na amostra com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
530,63	TiO ₂	33,29%	0,00%	0,00%
529,19	TiO ₂ /ZrO ₂ /MoO ₃	6,11%	0,00%	0,00%
532,59	C=O	12,83%	0,00%	18,78%
534,03	C-O-C, C-OH	4,67%	71,71%	71,23%
531,85	TiNO	19,29%	0,00%	0,00%
535,40	O e/ou H ₂ O absorvidas	0,00%	19,22%	5,60%
531,38	-OH	23,82%	0,00%	0,00%
536,56	TiO ₂ partículas de fumo	0,00%	9,07%	4,38%

Fonte: Produção do autor

Tabela 22- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do O 1s realizado na amostra com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
455,1	Ti metal	6,03%	0,00%	0,00%
458,5	TiO ₂	84,18%	100,00%	82,35%
456,3	Ti Sub óxido	9,79%	0,00%	17,65%

Fonte: Produção do autor

Tabela 23- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zr 2p realizado na amostra com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
183,7	Zr(OH) ₄	21,41%	0,00%	66,67%
182,8	ZrO ₂	39,50%	0,00%	0,00%
181,5	Zr Metal	39,09%	0,00%	0,00%
184,9	Zr O F	0,00%	100,00%	33,33%

Fonte: Produção do autor

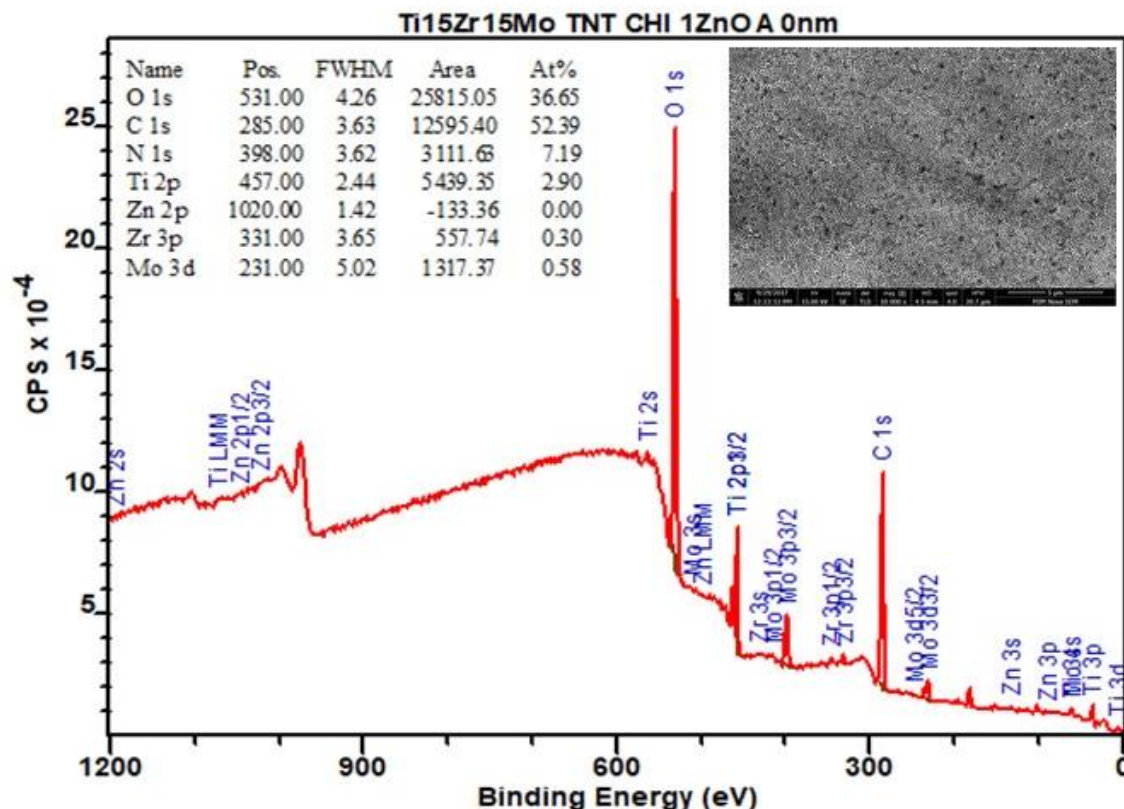
Tabela 24- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Mo 3d realizado na amostra com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
230,7	MoO ₂	57,04%	0,00%	0,00%
233,9	MoO ₃	40,02%	100,00%	100,00%
228,0	Mo metálico	2,94%	0,00%	0,00%

Fonte: Produção do autor

Podemos ver no detalhe da Figura 36 a superfície da amostra anodizada e recoberta pelas camadas poliméricas. Na imagem só é possível identificar a estrutura formada pelos nanotubos e na Figura 36 podemos ver o espectro de varredura da superfície da amostra que passou pela incorporação de partículas em solução de 1 mM de ZnO, mostrando a energia de ligação referente aos elementos químicos presente na superfície das amostras e a Tabela 25 contendo a concentração atômica relativa dos elementos na presente na superfície. O Carbono se apresenta como o mais abundante na superfície analisada, devido ao filme polimérico, enquanto o oxigênio mostra um aumento na concentração devido a remoção de boa parte do carbono após o primeiro etching e por constituir a camada de óxido dos nanotubos. Os elementos metálicos tendem a aumentar a concentração em função do número de etching por remover os elementos mais leves da superfície e conforme foi feita a remoção, a camada de análise se aproxima do substrato, aonde estão concentrados esses elementos.

Figura 36 - Espectro da liga com superfície de nanotubos recobertos com duas bicamadas e solução de 1 mM de ZnO com o detalhe da superfície dos nanotubos de TiO₂.



Fonte: Produção do autor

Tabela 25 - Concentração de elementos presente na superfície com nanotubos e recoberta com biopolímero e ZnO em diferentes profundidades de análise.

Etching	O 1s	C 1s	N 1s	Ti 2p	Zn 2p	Zr 3p	Mo 3d
0	38,30	47,51	7,40	5,40	0,01	0,53	0,86
75	50,88	9,25	14,65	19,85	0,01	2,06	3,32
750	47,94	2,50	20,30	22,50	0,02	2,43	4,31

Fonte: Produção do autor

A deconvolução dos espectros de alta resolução dos elementos C, O, Ti, Zr e Mo estão nas Tabela 26, 27, 28, 29 e 30, respectivamente. O Zn não foi detectado na superfície deste grupo de amostra.

O espectro de alta resolução do carbono apresentou formação principalmente dos grupos orgânicos (C-O, C-H, C-N) como principal grupo nos três níveis de análise. Para o oxigênio, a maior formação foi de ânion de O⁻ e na forma de TiO₂ nas camadas superficiais, enquanto que nas camadas mais internas, maior teor do oxigênio foram atribuídos ao ânion O⁻ enquanto o TiO₂, ZrO₂ e o MoO₃ apresentaram teores baixo se comparado com o ânion.

O espectro de alta resolução do Ti apresentou a formação de TiO_2 na superfície e conforme o foi removido material pelo *etching*, revelou a formação de subóxidos de Ti, aumentando gradualmente conforme aprofunda na análise. O Zr apresentou maior teor, na superfície, na forma metálica seguido pela forma de óxido, dado que se inverte ao se aprofundar, sendo maior o teor de ZrO_2 . A estrutura do Mo mostrou que na superfície ele está na forma de MoO_2 e após os *etching* ele está parcialmente na forma metálica.

Tabela 26 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do C 1s realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
283,3	Carbeto	9,7%	1,5%	5,8%
284,8	C-H	41,2%	38,3%	82,4%
285,7	C-N	0,0%	20,4%	0,0%
285,9	C-O, C-N	41,7%	37,1%	0,0%
287,6	-C=O- ou -O-C-O-	7,4%	0,0%	7,3%
288,2	C=O, C=N	0,0%	2,7%	4,5%

Fonte: Produção do autor

Tabela 27 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do O 1s realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
527,1	O	39,4%	85,3%	81,2%
528,8	TiO_2	31,8%	12,1%	17,2%
529,5	$TiO_2/ZrO_2/MoO_3$	27,3%	2,6%	1,6%
531,2	-OH	1,6%	0,0%	0,0%

Fonte: Produção do autor

Tabela 28 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Ti 2p realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

Posição	Atribuição	0	75	750
458,3	TiO_2	100,0%	80,2%	76,4%
455,8	Ti Subóxidos	0,0%	19,8%	23,6%

Fonte: Produção do autor

Tabela 29- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zr 2p realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
183,7	Zr	66,7%	0,0%	7,8%
182,8	ZrO_2	33,3%	100,0%	92,2%

Fonte: Produção do autor

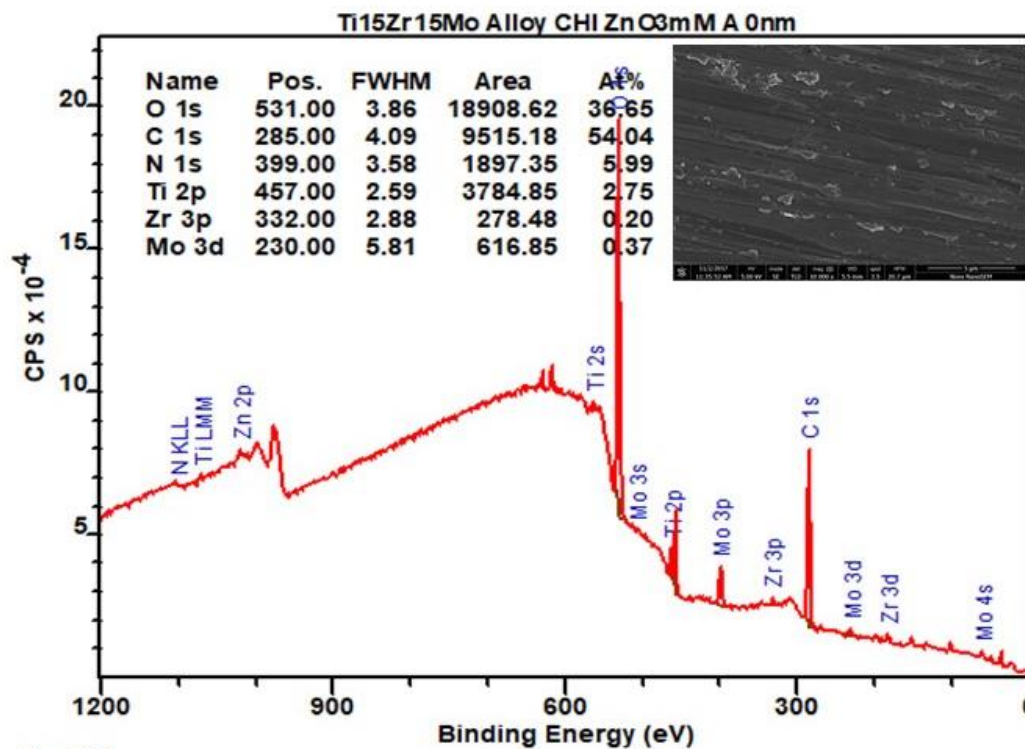
Tabela 30- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Mo 3d realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
228,5	Mo	0,00%	0,00%	53,25%
229,7	MoO2	90,19%	100,00%	46,75%
232,5	MoO3	9,81%	0,00%	0,00%

Fonte: Produção do autor

Na análise das amostras que foram funcionalizadas utilizando a solução de 3 mM de ZnO, podemos ver na Figura 37, no detalhe, a superfície da amostra lixada e recoberta com as bicamadas do biopolímero. Mostrando a superfície da liga lixada com os riscos do lixamento e partículas resultante do processo de polimerização. Não foi possível identificar partículas de ZnO. Na Figura 37, pode-se ver o espectro de varredura da liga após recobrimento com o polímero, estão identificados os elementos presentes na superfície do material tratado e a concentração atômica dos elementos encontrados, que também foram apresentados na Tabela 31, que apresenta a concentração dos elementos na superfície, analisadas em três camadas diferente. O carbono está associado a presença do polímero e a contaminações que ocorrem na superfície da amostra e conforme é realizado o etching, a sua concentração diminui. O oxigênio está presente nos grupos poliméricos, na estrutura de óxido e pode ser encontrado na forma gasosa. Os metais, como o Ti, Zr e Mo apresentam uma concentração baixa e conforme é realizado o etching das amostras esse teor aumenta.

Figura 37 - Espectro do XPS da amostra lixada, funcionalizada com duas bicamadas e em solução de 3 mM de ZnO.



CasaXPS

Fonte: Produção do autor

Tabela 31 - Tabela com a concentração de elementos presente na superfície com nanotubos e recoberta com biopolímero e ZnO 3nM em profundidades de análise.

Tempo de <i>etching</i>	C 1s	O 1s	N 1s	Ti 2p	Zr 3p	Mo 3d
0	26,71%	50,38%	5,23%	14,98%	1,22%	1,48%
75	6,46%	45,56%	8,38%	29,42%	2,77%	7,42%
750	5,19%	27,38%	10,42%	38,37%	3,98%	14,66%

Fonte: Produção do autor

As atribuições referentes aos picos gerados a partir da deconvolução dos espectros de alta resolução estão listados nas Tabelas de 32 até 36, referente aos elementos C, O, Ti, Zr e Mo.

O espectro de alta resolução mostrou que o C está nas formas de carbono alifáticos, na superfície, e nas camadas após o *etching* ele são atribuídos ao -C=O-, -O-C-O-, C-N e COOH. O oxigênio foi atribuído principalmente ao TiO₂, na superfície, e nas camadas após o *etching* foi atribuído aos grupos orgânicos.

As curvas da deconvolução do Ti foram atribuídas, principalmente, ao TiO₂ nas três profundidades medidas. Para o Zr apresentaram um comportamento semelhante, sendo atribuída ao ZrO₂ a maior porcentagem do Zr encontrado na superfície. No caso

do Mo, a maior concentração foi atribuída ao MoO₃, somente na superfície o MoO₂ aparece em maior proporção.

Tabela 32 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do C 1s realizado na amostra com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

Posição	Atribuição	0	75	750
282,9	Carbeto	7,1%	0,0%	0,0%
284,6	C-C, C-H	42,5%	12,1%	10,9%
285,5	C-N	15,6%	13,7%	27,0%
285,7	C-O	29,4%	11,6%	9,3%
287,6	-C=O- ou -O-C-O-	5,4%	34,7%	25,2%
288,5	COOH	0,0%	27,9%	27,6%

Fonte: Produção do autor

Tabela 33 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do O 1s realizado na amostra com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

Posição	Atribuição	0	75	750
529,41	TiO ₂ /ZrO ₂ /MoO ₃	4,0%	0,0%	0,0%
530,34	TiO ₂	40,0%	0,0%	0,0%
531,49	-OH	16,9%	0,0%	0,0%
531,79	TiNO	8,5%	0,0%	0,0%
532,58	C=O	25,1%	8,1%	10,0%
533,94	C-O-C, C-OH	5,6%	68,3%	63,5%
535,23	O ou H ₂ O absorvido	0,0%	16,1%	17,8%
536,55	TiO ₂ partículas de fumo	0,0%	7,5%	8,6%

Fonte: Produção do autor

Tabela 34- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Ti 2p realizado na amostra com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
458,471	TiO ₂	86,7%	85,1%	73,7%
457,89	Ti-OH	0,0%	0,0%	26,3%
456,254	Ti Subóxido	13,3%	14,9%	0,0%

Fonte: Produção do autor

Tabela 35 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zr 2p realizado na amostra com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
183,6	Zr(OH) ₄	16,8%	5,5%	33,3%
183,3	ZrO ₂	49,9%	86,2%	66,7%
181,4	Zr metal	33,3%	8,3%	0,0%

Fonte: Produção do autor

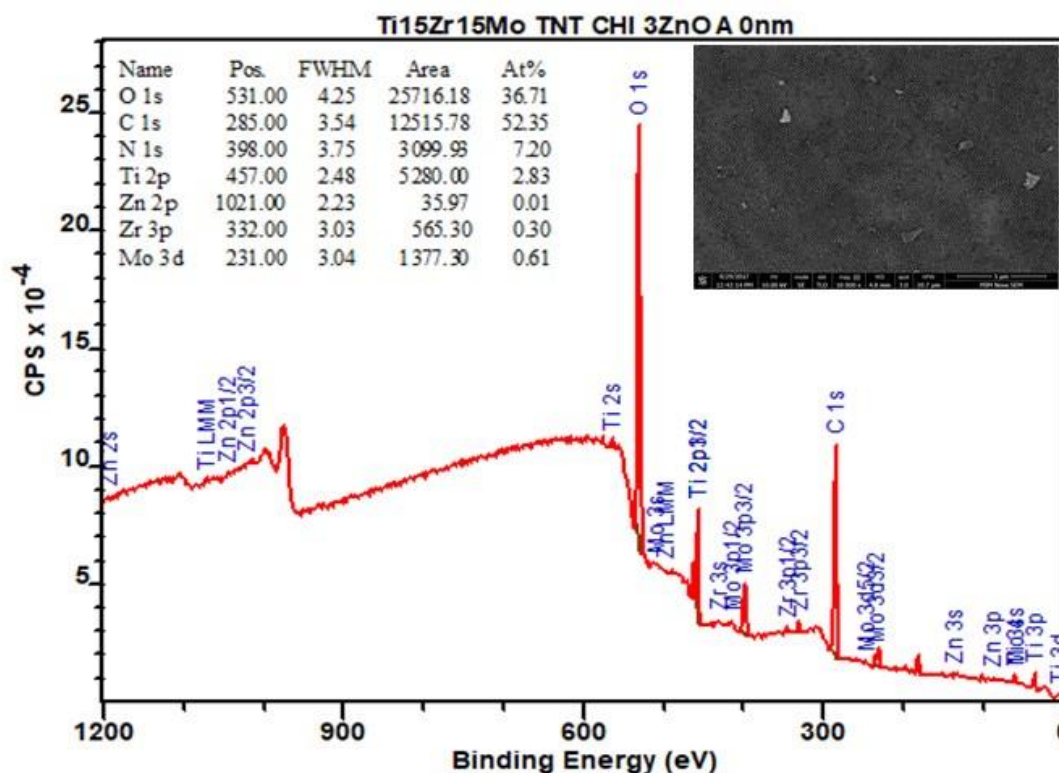
Tabela 36 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Mo 3d realizado na amostra com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
231,3	MoO ₂	53,19%	0,00%	0,00%
234,1	MoO ₃	40,05%	100,00%	100,00%
228,3	Mo metal	6,76%	0,00%	0,00%

Fonte: Produção do autor

Para a amostra com a superfície com nanotubos e recoberta com o polímero e utilizando a solução de 3 mM para incorporação das partículas de ZnO, a micrografia da superfície da amostra está exposta no detalhe da Figura 38, aonde podemos ver a formação dos nanotubos e algumas regiões aonde formaram partículas de polímeros depositadas sobre a superfície e na Figura 38 podemos ver o espectro de varredura da amostra com nanotubos e os pico referente aos elementos presente na análise. A Tabela 34 contém os teores de cada elemento presente nas regiões analisadas com diferentes tempos de *etching*. Percebe-se que o C tende a diminuir conforme o *etching* é feito, os metais (com exceção do Zn) tendem a aumentar devido ao decréscimo do C que era um contaminante em maior número na superfície. O oxigênio tende a aumentar devido a camada de óxido referente ao nanotubos.

Figura 38 - Espectro do XPS da amostra com nanotubos funcionalizadas com duas bicamadas e solução de 3 mM de ZnO.



Fonte: Produção do autor

Tabela 37 - Concentração de elementos presente na superfície recoberta com biopolímero e ZnO 3 mM em profundidades de análise.

	O 1s	C 1s	N 1s	Ti 2p	Zr 3p	Mo 3d	Zn 2p
0	35,80	51,44	7,42	4,14	0,44	0,74	0,02
75	49,15	11,55	14,88	19,03	2,01	3,38	0,00
750	47,92	1,99	20,79	22,36	2,45	4,49	0,00

Fonte: Produção do autor

Os espectros de alta resolução foram expostos nas Tabelas de 38 até a 42 mostrando as atribuições aos picos resultante da deconcolução dos espectros de alta resolução dos elementos: C, O, Ti, Zr e Mo para análises realizadas com três tempos de *etching* (0, 75 e 750 s). Os valores estão em % da contração de atribuição para cada camada analisada.

As atribuições do C (Tabela 38), podemos ver que maior concentração para a superfície foi atribuída ao C-H, enquanto que para camada após o primeiro *etching* foi atribuída a ligação C-N, na camada mais profunda, a maior concentração foi atribuída a ligação C-H. O oxigênio apresentou picos distribuídos entre os óxidos metálicos (TiO₂, ZrO₂ e MoO₃) e com o anión O⁻, após o *etching* a proporção do anión aumenta significativamente.

Para os metais, o Ti apresentou predominantemente a formação de TiO_2 em todas camadas analisadas. A presença da formação de subóxidos foi constatada a partir do *etching* de 75 s e sua proporção cresceu após o segundo *etching* de 750 s. No caso do Zr, foi detectado formação de Zr metálico e de seu óxido. Na superfície predomina a formação do Zr metálico enquanto que nas camadas após o *etching* o ZrO_2 se mostra predominante. Já o Mo apresentou maior formação do MoO_2 por todas as camadas analisadas.

Tabela 38 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do C 1s realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
282,8	Carbeto	0,0%	0,0%	12,0%
284,6	C-H	48,3%	0,0%	54,2%
285,3	C-O	18,9%	38,2%	9,7%
285,7	C-N	0,0%	57,1%	14,4%
286,4	C-O, C-N	27,3%	0,0%	5,7%
287,8	-C=O	5,5%	0,0%	0,0%
288,7	COOH	0,0%	1,8%	2,0%
289,1	O-C=O	0,0%	2,9%	2,1%

Fonte: Produção do autor

Tabela 39 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do O 1s realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
527,1	O-	32,8%	73,4%	83,0%
528,8	TiO ₂	37,9%	23,0%	14,4%
529,4	TiO ₂ /ZrO ₂ /MoO ₃	26,4%	3,6%	2,6%
531,1	-OH	2,8%	0,0%	0,0%

Fonte: Produção do autor

Tabela 40 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Ti 2p realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
455,8	Ti Subóxido	0,0%	12,0%	24,7%
457,9	Ti-OH	0,0%	0,0%	13,6%
458,6	TiO ₂	100,0%	88,0%	61,8%

Fonte: Produção do autor

Tabela 41- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zr 2p realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
---------	------------	---	----	-----

181,0	Zr	66,7%	0,0%	12,9%
182,8	ZrO ₂	33,3%	100,0%	87,2%

Fonte: Produção do autor

Tabela 42- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Mo 3d realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 3mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
228,5	Mo	0,00%	0,00%	16,44%
229,7	MoO ₂	86,37%	100,00%	83,56%
232,3	MoO ₃	13,63%	0,00%	0,00%

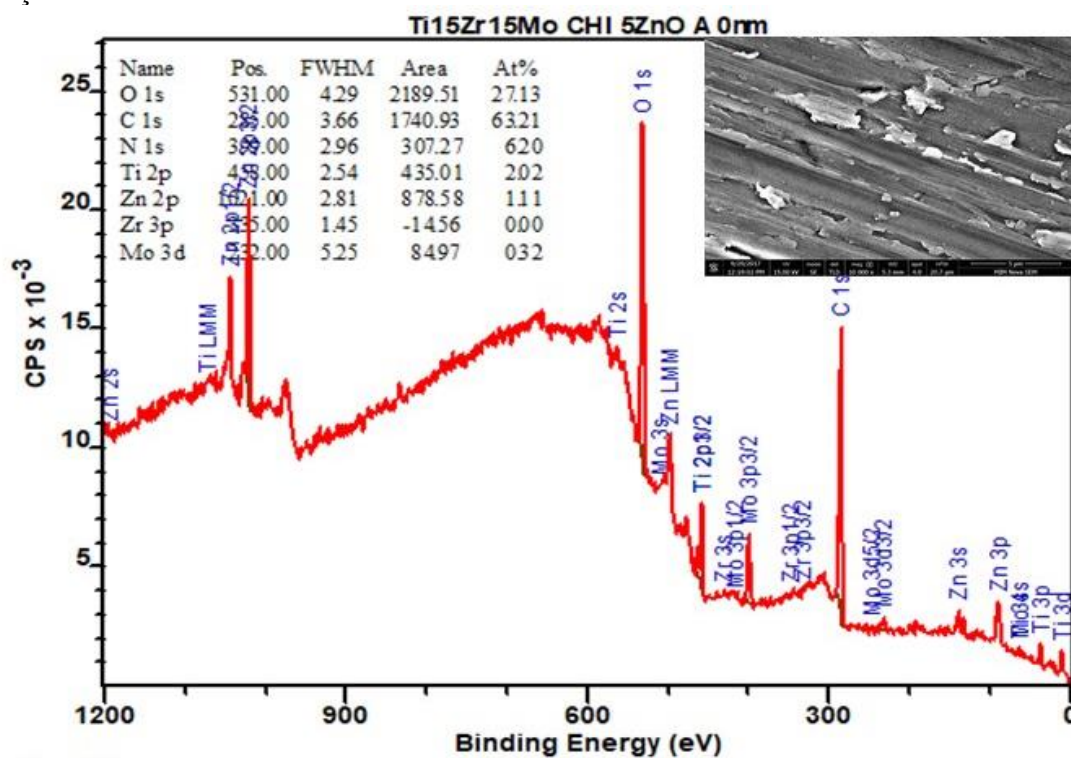
Fonte: Produção do autor

No grupo das amostras funcionalizadas com a solução de 5 mM ZnO, foram estudadas amostras da liga Ti15Zr15Mo sem tratamento de superfície e com formação de nanotubos, nos dois casos as amostras foram recobertas com duas bicamadas de ácido hialurônico, quitosana e incorporadas partículas de ZnO utilizando uma solução de ZnO com concentração de 5 mM.

Podemos ver na Figura 39 o espectro de varredura da composição química da superfície da liga com os picos identificados com os respectivos elementos que estão na superfície do material e na Tabela 43 observamos os elementos presente na superfície e a sua concentração em função da camada analisada. No detalhe da Figura 39 podemos ver a superfície lixada da amostra recoberta pelas camadas do biopolímero. Pode-se notar a presença de algumas partículas resultante da polimerização e que ficaram aderidas na superfície.

O C tem um decaimento conforme é feito o *etching* e o O e os metais (Ti, Zr, Mo e Zn) tem sua proporção aumentada conforme foram analisadas camadas mais profundas devido a diminuição do número de carbono, atribuído em muitos casos a contaminação, mas neste caso há uma parcela referente ao polímero. O oxigênio está associado aos grupos orgânicos e a formação dos óxidos metálicos. Os metais estão associados ao substrato e ao óxido na superfície das amostras. O Zn apresenta um valor muito baixo e está relacionado com o material que está sendo incorporado.

Figura 39 - Espectro de XPS da liga lixada funcionalizada com duas bicamadas e solução de 5 mM de ZnO.



Fonte: Produção do autor

Tabela 43 - Concentração de elementos presente na superfície recoberta com biopolímero e ZnO 5 mM em profundidades de análise.

	O 1s	C 1s	N 1s	Ti 2p	Zn 2p	Zr 3p	Mo 3d
0	33,10	32,24	15,31	14,62	0,98	1,22	2,54
75	37,93	12,01	20,31	23,28	0,93	1,68	3,85
750	25,93	11,24	27,44	26,20	0,88	2,58	5,72

Fonte: Produção do autor

As curvas obtidas da deconvolução dos espectros de alta resolução dos elementos C, O, Ti, Zr, Mo e Zn estão expostos nas Tabelas 44, 45, 46, 47, 48 e 49 (respectivamente), mostrando a concentração relativa de cada atribuição à camada correspondente.

O teor do carbono encontrado nas camadas foi atribuído principalmente ao carbono ligado ao hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e com o próprio carbono. O oxigênio foi atribuído em sua maioria a forma de óxido metálico (TiO_2 , ZrO_2 e MoO_3).

As curvas referentes ao titânio foram atribuídas principalmente ao dióxido de titânio e na camada intermediárias e profundas, foram atribuídos ao subóxidos de titânio e ao titânio metálico. Para o Zr, os picos foram atribuídos ao Zr metálico e ao ZrO_2 . Os picos do Mo foram atribuídos para o Mo metálico e para o MoO_2 , este presente com

maior proporção nas camadas superficiais e o Mo metálico nas camadas com o maior tempo de *etching*. O Zr foi encontrado predominantemente na forma de óxido.

Tabela 44 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do C 1s realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 5mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
282,4	Carboneto	0,0%	0,0%	17,0%
284,8	C-C, C-H	37,5%	56,9%	50,7%
286,3	C-O, C-N	53,7%	34,5%	33,5%
286,9	C=N	0,0%	4,4%	0,0%
288,2	C=O, C=N	8,9%	0,0%	0,0%
288,4	COOH	0,0%	4,3%	0,0%

Fonte: Produção do autor

Tabela 45 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do O 1s realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 5mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
528,8	TiO ₂	64,8%	51,5%	73,2%
529,6	TiO ₂ /ZrO ₂ /MoO ₃	6,8%	14,0%	9,9%
531,8	TiNO	2,5%	0,0%	0,0%
527,3	O ⁻	25,9%	34,5%	17,0%

Fonte: Produção do autor

Tabela 46 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Ti 2p realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 5mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
454,4	Ti metal	0,0%	0,0%	30,2%
458,5	TiO ₂	90,6%	60,3%	36,0%
458,0	Ti-OH	0,0%	3,6%	0,0%
455,8	Ti Subóxido	9,4%	36,1%	26,5%
455,2	TiNO	0,0%	0,0%	7,3%

Fonte: Produção do autor

Tabela 47- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zr 2p realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 5mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
180,4	Zr	83,8%	7,4%	100,0%
182,8	ZrO ₂	16,2%	69,3%	0,0%
183,4	Zr(OH) ₄	0,0%	23,3%	0,0%

Fonte: Produção do autor

Tabela 48 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Mo 3d realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 5mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
227,9	Mo	23,01%	35,32%	93,04%
229,4	MoO ₂	76,99%	64,68%	6,96%

Fonte: Produção do autor

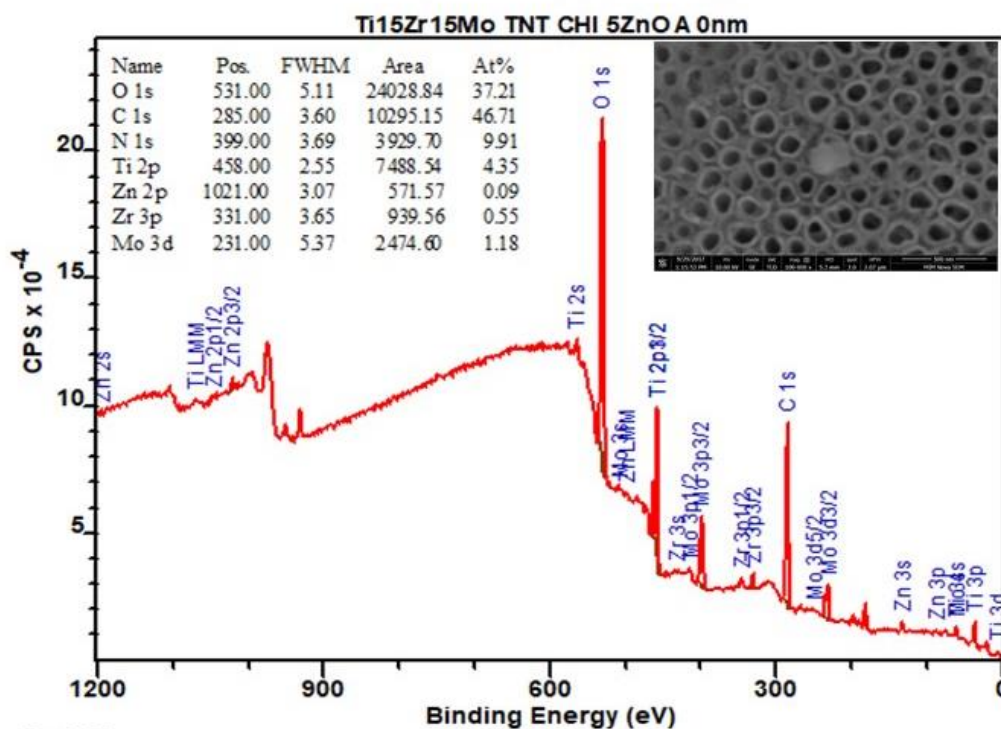
Tabela 49- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zn 3d realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 5mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
1020,6	Zn	0,00%	2,34%	0,00%
1022,5	ZnO	100,00%	97,66%	100,00%

Fonte: Produção do autor

Na Figura 40 podemos ver o espectro de varredura com os picos referente aos elementos presente na superfície e da amostra e na Tabela 50 a concentração relativa de cada elemento presente na superfície e em camadas após o *etching* de 75 e 750 segundos.

Figura 40 - Espectro de XPS da liga com superfície com nanotubos funcionalizados com duas bicamadas e solução de 5 mM de ZnO.



Fonte: Produção do autor

A camada superficial da amostra apresenta maior quantidade de C, atribuído à possíveis contaminações do manuseio da amostra e ao carbono presente no filme

polimérico. A concentração relativa do carbono reduz conforme foi realizado o etching para se alcançar as camadas internas. O oxigênio apresenta um aumento na sua concentração pela remoção do C da superfície e pela estrutura de nanotubos formada por óxidos metálicos.

Os metais, componentes da liga, tendem a aumentar conforme o etching é realizado, devido a remoção do carbono que tinha a maior concentração atômica na superfície e por penetrar nas camadas internas do material. Outro metal presente no material é o Zn pertencente as partículas, que neste caso está presente, mesmo com uma concentração muito baixa e a cada etching ele diminui devido a remoção de mais camadas.

Tabela 50- Concentração de elementos presente na superfície com nanotubos e recoberta com biopolímero e ZnO 5mM em profundidades de análise.

	O 1s	C 1s	N 1s	Ti 2p	Zn 2p	Zr 3p	Mo 3d
0	35,83	49,67	6,96	5,28	1,60	0,14	0,52
75	48,86	2,10	19,07	24,07	0,79	1,85	3,26
750	21,31	1,22	33,25	34,24	0,33	2,58	7,07

Fonte: Produção do autor

A deconvolução dos espectros de alta resolução da amostra resultou nos picos que foram atribuídos aos elementos nas Tabelas de 51 até 56 referentes aos elementos C, O, Ti, Zr, Mo e Zn (respectivamente).

O carbono apresenta sua na forma ligado ao hidrogênio e ao oxigênio sendo mais abundante nas três camadas analisadas. O oxigênio foi identificado, principalmente, ligado ao titânio ou como um ânion.

O titânio está presente principalmente ligado ao oxigênio formando um óxido metálico, enquanto que o zircônio está presente na superfície na forma metálica e nas demais camadas está na forma de óxido metálico. O molibdênio está predominantemente na forma de óxido metálico, enquanto que nas camadas inferiores, apresenta na forma metálica. O zinco só foi encontrado na superfície e parte dele na forma metálica e na forma de óxido.

Tabela 51- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do C 1s realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
282,8	Carbeto		0,0%	0,6% 16,4%
284,6	C-H		78,5%	16,3% 54,9%
285,9	COH, COC, CN, CNH2		0,0%	0,0% 14,0%
286,0	C-O		21,5%	79,1% 0,0%
287,6	-C=O		0,0%	0,0% 14,6%
288,6	COOH		0,0%	2,0% 0,0%

Fonte: Produção do autor

Tabela 52- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do O 1s realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
528,75	TiO2	34,6%	29,5%	35,0%
529,44	TiO2/ZrO2/MoO3	20,9%	6,3%	7,4%
527,19	O-	40,9%	64,3%	57,6%
531,24	-OH	3,5%	0,0%	0,0%

Fonte: Produção do autor

Tabela 53- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Ti 2p realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
458,602	TiO2	100,0%	75,4%	64,2%
457,89	Ti-OH	0,0%	0,0%	5,6%
456,1775	Ti Subóxido	0,0%	19,8%	26,2%
455,02	TiNO	0,0%	4,9%	4,0%

Fonte: Produção do autor

Tabela 54 - Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zr 2p realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSICÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
180,9	Zr	100,0%	8,4%	7,1%
183,5	Zr(OH)4	0,0%	19,8%	0,0%
182,5	ZrO2	0,0%	71,7%	92,9%

Fonte: Produção do autor

Tabela 55- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Mo 3d realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
228,4	Mo	3,98%	32,86%	24,50%
230,0	MoO2	96,02%	67,14%	75,50%

Fonte: Produção do autor

Tabela 56- Atribuição dos picos do espectro de alta resolução do Zn 3d realizado na amostra com superfície de nanotubos e com recobrimento utilizando 2 bicamadas e solução de ZnO com 1mM de concentração.

POSIÇÃO	ATRIBUIÇÃO	0	75	750
1020,6	Zn	57,00%	0	0
1022,5	ZnO	43,00%	0	0

Fonte: Produção do autor

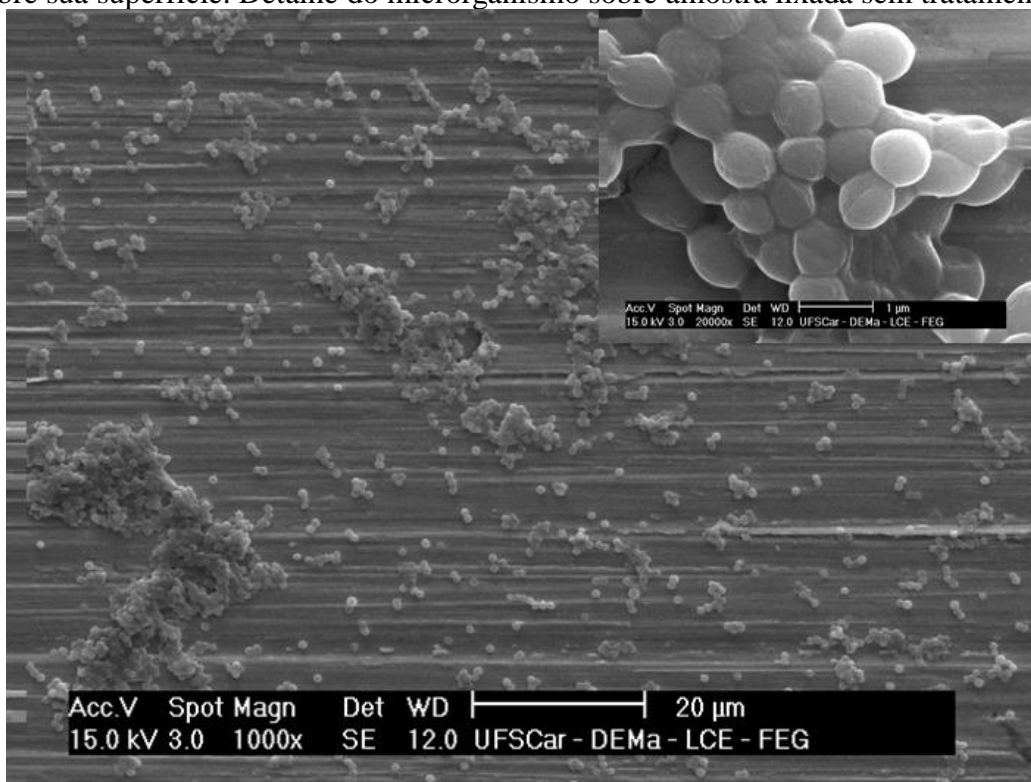
4.4 ESTUDO IN VITRO – ADESÃO BACTERIANA

O estudo da adesão bacteriana foi realizado com a bactéria *Staphylococcus aureus* sobre as amostras com diferentes condições: liga sem tratamento, liga com formação de nanotubos, recobertas por duas bicamadas de ácido hialurônico, quitosana e nanopartículas de ZnO 1 mM, 3mM e 5 mM.

Um grupo contendo somente as bactérias foram cultivadas em um poço sem amostra, servindo como referência para o verificar a influência do tratamento no crescimento bacteriano sobre amostra. Na Figura 41, é possível observar a superfície da liga Ti15Zr15Mo com microrganismos que cresceram durante o período de incubação das amostras.

Os microrganismos se apresentam distribuído por toda a superfície, formando pequenas colônias de bactéria, sendo uma boa parte ainda dispersas pela superfície da amostra. Podemos ver o detalhe de uma pequena colônia sobre a superfície da amostra em maior aumento.

Figura 41 - Superfície da amostra lixada sem tratamento, com microrganismos crescido sobre sua superfície. Detalhe do microrganismo sobre amostra lixada sem tratamento.



Fonte: Produção do autor

Podemos ver na Figura 42 a adesão e a proliferação bacteriana sobre superfície da amostra após o crescimento dos nanotubos empregando oxidação anódica. É possível observar um menor agrupamento das bactérias quando se compara a superfície da liga sem tratamento.

De acordo com a literatura a presença de nanotubos de TiO_2 tem capacidade de reduzir o crescimento e proliferação bacteriana. Os nanotubos com diâmetro de 80 nm apresentaram melhor resposta bactericida, o resultado foi associado aos fatores químicos da superfície (maior concentração de oxigênio e flúor) (PENG *et al.*, 2013). O nanotubos de TiO_2 , quando irradiadas raios ultra violeta, induzem a formação de O_2^- , $^*\text{OH}$, H_2O_2 levando a morte da bactéria devido a característica fotocatalítica da estrutura formada (PODPORSKA-CARROLL *et al.*, 2015). Podemos observar na

Figura 42 - Superfície da amostra com superfície de nanotubos, com microrganismos crescido sobre sua superfície.



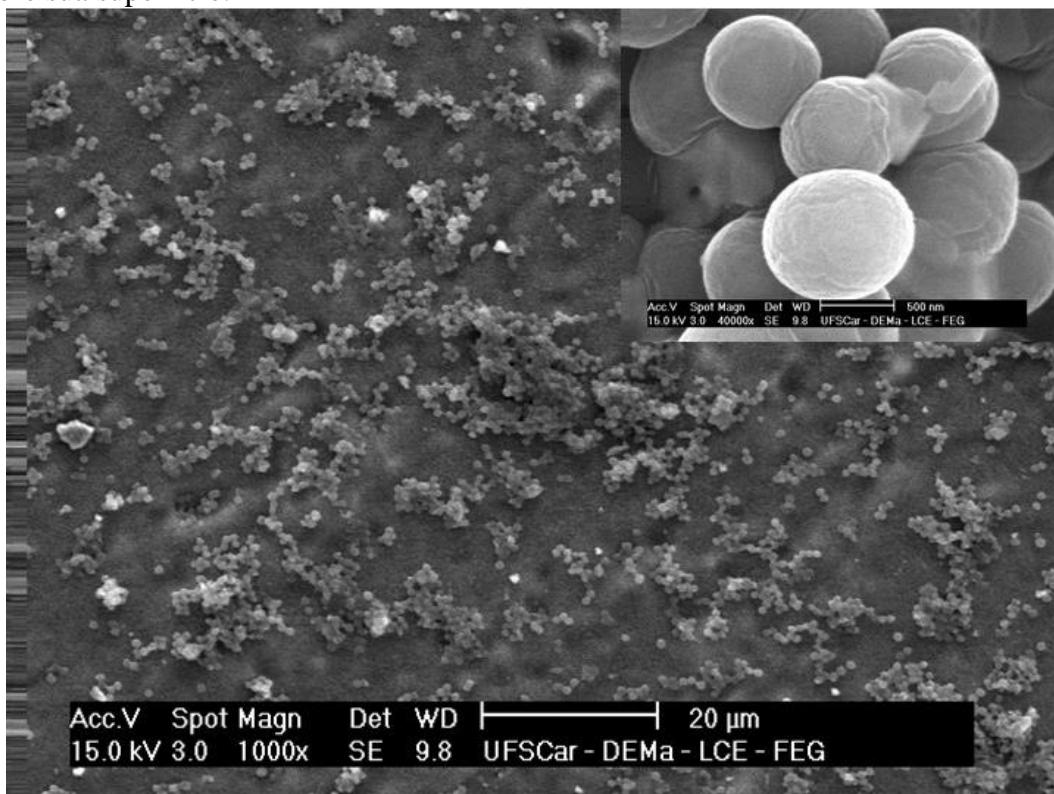
Fonte: Produção do autor

A adição do revestimento polimérico não alterou esse comportamento apesar do comportamento bactericida verificado na literatura para esses filmes com relação aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Xylella Fastidiosa* e *Pseudomonas Aeruginosa* (HERNANDEZ-MONTELONGO *et al.*, 2016).

Na Figura 43, podemos ver a superfície da amostra e a quantidade de microrganismos que cresceram e aderiram sobre a superfície da amostra recoberta com as camadas poliméricas e as partículas de ZnO e no detalhe podemos ver um grupo de microrganismos sobre a superfície de nanotubos. Visualmente, esta condição está semelhante ao da amostra lixada, não sendo percebido diferença na quantidade de bactérias pelas micrografias. Comparando com os resultados obtidos no XPS, este grupo não apresentou uma concentração de partículas de ZnO que atingisse o mínimo para inibir ou matar as bactérias.

Os agentes bactericidas na forma de partículas de óxidos metálicos podem levar a morte das bactérias por contato ou liberação dos elementos resultante de processos químicos de formação de H₂O₂, como as que ocorrem com os processos fotocatalíticos (PODPORSKA-CARROLL *et al.*, 2015)

Figura 43 - Superfície da amostra com superfície de nanotubos e recobertos com o biopolímero e partículas de ZnO (solução de 1 mM), com microrganismos crescendo sobre sua superfície.



Fonte: Produção do autor

Na Figura 44 podemos ver a superfície da amostra que utilizou a solução contendo 3 mM de ZnO. Nela, estão os microrganismos distribuídos sobre a superfície das amostras e em algumas regiões estão formando aglomerados e no detalhe da imagem podemos analisar a imagem da bactéria de forma mais detalhada sobre a superfície da amostra após o tratamento de superfície. Igual ao grupo de 1 mM, esta amostra também não apresentou capacidade de reduzir ou inibir o número de bactérias na superfície da amostra após o tratamento.

Figura 44 - Superfície da amostra com nanotubos e recobertos com o biopolímero e partículas de ZnO (solução de 3 mM), com microrganismos crescido sobre sua superfície.



Fonte: Produção do autor

Na Figura 45 podemos ver a superfície da amostra modificada com o recobrimento polimérico utilizando solução de ZnO de 5 mM. Nesta imagem pode-se ver a distribuição de grupos de bactéria sobre a amostra de forma bem distribuída e com algumas concentrações de bactéria sobre a superfície da amostra. Na Figura 45 pode-se ver em detalhes os microrganismos sobre os nanotubos. Esta condição foi a que se mostrou mais eficiente em relação aos grupos testados, mesmo assim ainda apresenta um número elevado de microrganismos sobre a superfície da amostra. A concentração de partículas de ZnO presente na superfície é muito pequena se comparada com a concentração mínima para inibir ou matar as bactérias na superfície que seria 1 mM de nanopartículas em solução (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2012)

Figura 45 - Superfície da amostra com superfície de nanotubos e recobertos com o biopolímero e partículas de ZnO (solução de 5 mM), com microrganismos crescendo sobre sua superfície.

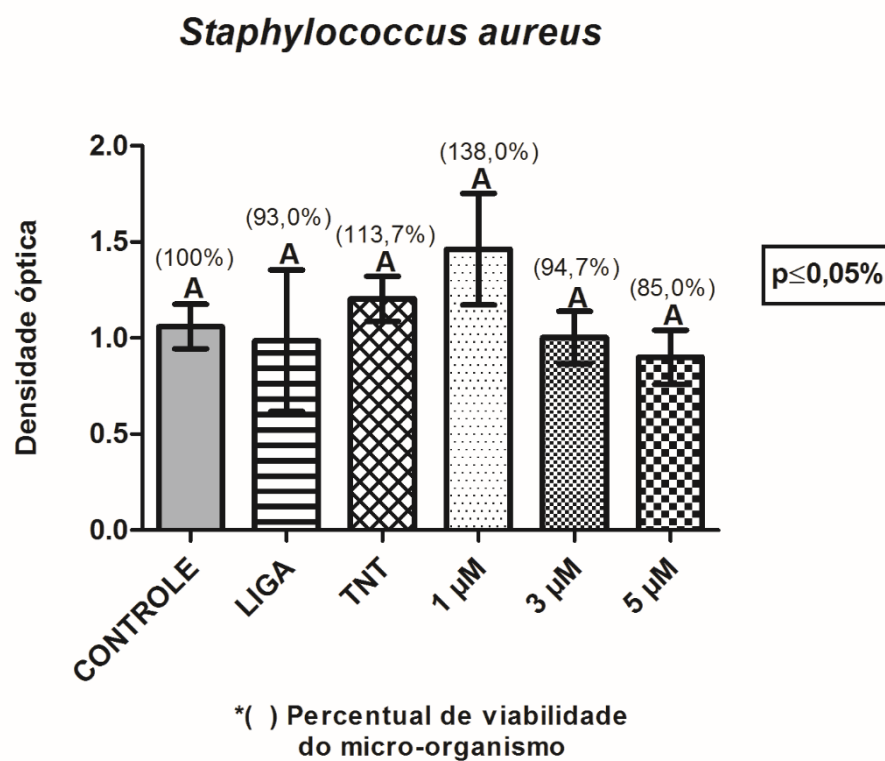


Fonte: Produção do autor

Na Figura 46 foi apresentado o gráfico com a contagem de número de microrganismos após o ensaio de MTT, a atividade metabólica dos microrganismos sobre as diferentes amostras foi verificada pela quantidade medição da quantidade de sal convertido. Para o experimento, um grupo de poços sem amostra foi cultivado sob as mesmas condições das que foram realizados os ensaios com as amostras e que foi considera como referência para análise estatística, comparando o grupo controle e os diferentes grupos analisados. Em comparação com o grupo controle, o grupo da liga sem tratamento teve uma contagem de microrganismos ligeiramente menor, com uma diferença de 7%. O grupo das amostras somente com a superfície de nanotubos teve um aumento de 13,7% em relação ao controle, enquanto o grupo com nanotubos e recoberto com o biopolímero e partículas de ZnO utilizando concentração de 1 mM teve a maior diferença que foi um aumento de 38%. O grupo contendo 3 mM de ZnO obteve um resultado semelhante ao do grupo sem tratamento superficial (6% menor que grupo controle), enquanto o grupo com 5 mM obteve o melhor resultado com uma redução de 15%. Porém, utilizando um fator de correlação de 95% entre os grupos e o grupo

controle, observou-se que não há uma diferença significativa entre os grupos pesquisados.

Figura 46 - Proliferação bacteriana sobre os diferentes grupos testados.



Fonte: Produção do autor

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho obteve o tratamento de superfície da liga Ti15Zr15Mo associando a formação dos nanotubos com o revestimento com o revestimento polimérico de multicamadas, empregando ácido hialurônico/quitosana/partículas de ZnO. Porém esse tratamento não obteve as características bactericidas esperadas.

O processamento da liga levou a obtenção de uma liga de titânio do tipo β , que apresenta características propícias para aplicações biomédicas devido ao módulo de elasticidade reduzido se comparado com as ligas utilizadas atualmente (Ti-CP e Ti6Al4V). A superfície dessa liga apresenta uma formação de óxidos além do TiO_2 , como o ZrO_2 e MoO_3 além dos subóxidos dos elementos presente na composição da liga.

Os parâmetros utilizados para anodização da liga Ti15Zr15Mo neste trabalho, mostram que a potencial de 20 V formou uma estrutura nanoporosa enquanto que a potencial de 30 V formou uma estrutura nanotubular. Na estrutura nanotubular, a tensão tem maior influência no diâmetro dos nanotubos. A calcinação da estrutura cristalina amorfa após a anodização utilizando temperatura de 450 °C estabilizou a fase anatase.

A camada de óxido formada pela oxidação anódica apresentou uma mistura de óxidos de titânio, zircônio e molibdênio, além de apresentar hidróxidos e subóxidos.

A funcionalização de superfície de nanotubos mostrou-se possível formação das camadas e recobrimento da superfície de nanotubos. A técnica empregada mostrou-se eficaz em cobrir os nanotubos com o polímero, podendo ser empregada para o uso dos nanotubos como um recipiente para o medicamento ou nanopartículas, mas nesse caso não seria possível aproveitar a os benefícios da topografia dos nanotubos, uma vez que os mesmos seriam sobrepostos. A cópia da superfície do nanotubos pelas bicamadas do polímero foi um desafio que necessita de mais estudos.

O emprego das bicamadas de ácido hialurônico e quitosana como um meio de incorporação de nanopartículas de ZnO mostrou eficiente, visto que as partículas de ZnO foram identificadas, mesmo que em baixas concentrações, sobre as amostras recobertas. Um estudo mais aprofundado deve ser feito visando um controle melhor da concentração de ZnO na superfície do recobrimento

As condições estudadas neste trabalho não apresentaram diferença significativa nas propriedades bactericidas, sendo necessário um estudo mais aprofundado nos parâmetros de formação do filme e de incorporação das nanopartículas.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudo dos parâmetros do tratamento de superfícies utilizado o método *layer-by-layer* com o ácido hialurônico/quitosana para obter um filme que consiga copiar a forma dos nanotubos e assim aproveitar os benefícios da topografia dos nanotubos e do filme fino em multicamadas.

Determinar a concentração mínima necessária de partículas de ZnO para obter propriedades bactericidas seguindo o processamento apresentado neste trabalho.

Adequação do método de incorporação das partículas de ZnO ou de outro medicamento, utilizando os nanotubos como reservatório para liberação controlada.

REFERENCIAS

- AGARWAL, P.; PARAMASIVAM, I.; SHRESTHA, N. K.; SCHMUKI, P. MoO₃ in self-organized TiO₂ nanotubes for enhanced photocatalytic activity. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 5, n. 1, p. 66–69, 2010. Acesso em dez. 2017
- AMARAL, I. F.; GRANJA, P. L.; BARBOSA, M. a. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 16, n. 12, p. 1575–1593, 2005. Acesso em nov. 2017
- ANSELME, K. Biomaterials and interface with bone. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 6, p. 2037–2042, 2011.
- BARR, T. L. An ESCA study of the termination of the passivation of elemental metals. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 82, n. 16, p. 1801–1810, 1978. Acesso em dez. 2017
- BENSCH, W.; HELMER, O.; MUHLER, M.; EBERT, H.; KNECHT, M. Experimental and theoretical bandstructure of the layer compound ZrSiTe. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 10, p. 3326–3330, 1995. Acesso em dez. 2017
- BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros**, v. 9, n. 4, p. 163–169, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14281999000400027&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em dez. 2017
- BOULMER-LEBORGNE, C.; HERMANN, J.; DUBREUIL, B.; BRAULT, P.; DEGIORGI, M. L.; LEGGIERI, G.; LUCHES, A.; MARTINO, M.; PERRONE, A.; MIHAILESCU, I. N. Direct carbidation of titanium as a result of multipulse UV-laser irradiation of titanium samples in an ambient methane gas. **Applied surface science**, v. 54, p. 349–352, 1992. Acesso em dez. 2017
- BRAMMER, K. S.; FRANDSEN, C. J.; JIN, S. TiO₂ nanotubes for bone regeneration. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 315–322, 2012. Acesso em dez. 2017
- BUI, V. K. H.; PARK, D.; LEE, Y. C. Chitosan combined with ZnO, TiO₂ and Ag nanoparticles for antimicrobial wound healing applications: A mini review of the research trends. **Polymers**, v. 9, n. 1, 2017. Acesso em dez. 2017
- CALLEN, B. W.; LOWENBERG, B. F.; LUGOWSKI, S.; SODHI, R. N. S.; DAVIES, J. E. Nitric acid passivation of Ti6Al4V reduces thickness of surface oxide layer and increases trace element release. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 29, n. 3, p. 279–290, 1995. Acesso em dez. 2017
- CAPELLATO, P.; RIEDEL, N. a; WILLIAMS, J. D.; MACHADO, J. P. B.; POPAT, K. C.; CLARO, A. P. R. A. Surface Modification on Ti-30Ta Alloy for Biomedical Application. v. 2013, n. September, p. 707–713, 2013. Acesso em out. 2017

CAPELLATO, P.; SMITH, B. S.; POPAT, K. C.; CLARO, A. P. R. A. Fibroblast functionality on novel Ti₃₀Ta nanotube array. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 7, p. 2060–2067, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.05.013>>. Acesso em ago. 2017

CHASTAIN, J.; KING, R. C.; MOULDER, J. **Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy: a reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data**. [s.l.] Physical Electronics Division, Perkin-Elmer Corporation Eden Prairie, Minnesota, 1992. Acesso em nov. 2017

CHAVES, J. M.; ESCADA, A. L. A.; RODRIGUES, A. D.; ALVES CLARO, A. P. R. Characterization of the structure, thermal stability and wettability of the TiO₂ nanotubes growth on the Ti-7.5Mo alloy surface. **Applied Surface Science**, v. 370, p. 76–82, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.02.017>>. Acesso em dez. 2017

CHENG, L.; ZHOU, X. The anti-caries effects of dental adhesive resin influenced by the position of functional groups in quaternary ammonium monomers. **Dental Materials**, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.021>>. Acesso em dez. 2017

CHUA, P. H.; NEOH, K. G.; KANG, E. T.; WANG, W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. **Biomaterials**, v. 29, n. 10, p. 1412–1421, 2008. Acesso em dez. 2017

CORREA, D. R. N.; KURODA, P. A. B.; GRANDINI, C. R. Structure, Microstructure, and Selected Mechanical Properties of Ti-Zr-Mo Alloys for Biomedical Applications. **Advanced Materials Research**, v. 922, p. 75–80, 2014. Disponível em: <<http://www.scientific.net/AMR.922.75>>. Acesso em dez. 2017

CORREA, D. R. N.; VICENTE, F. B.; ARAÚJO, R. O.; LOURENÇO, M. L.; KURODA, P. A. B.; BUZALAF, M. A. R.; GRANDINI, C. R. Effect of the substitutional elements on the microstructure of the Ti-15Mo-Zr and Ti-15Zr-Mo systems alloys. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 4, n. 2, p. 180–185, 2015. Acesso em dez. 2017

CORREA, D. R. N.; VICENTE, F. B.; DONATO, T. A. G.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; BUZALAF, M. A. R.; GRANDINI, C. R. The effect of the solute on the structure, selected mechanical properties, and biocompatibility of Ti-Zr system alloys for dental applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 34, n. 1, p. 354–359, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.09.032>>. Acesso em dez. 2017

DAVIES, P. R.; ROBERTS, M. W.; SHUKLA, N. The reactive chemisorption of formic acid at Al(111) surfaces and the influence of surface oxidation and coadsorption with water: A combined XPS and HREELS investigation. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 3, n. S, 1991. Acesso em dez. 2017

DELPEUX, S.; BEGUIN, F.; BENOIT, R.; ERRE, R.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I. Fullerene core star-like polymers—1. Preparation from fullerenes and monoazidopolyethers. **European Polymer Journal**, v. 34, n. 7, p. 905–915, 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305797002255>>. Acesso em dez. 2017

DIAGRAMA: Ti-Mo. Diagrama de fase do tipo binário dos elementos titânio e molibdênio. Disponível em: <<http://www.infomet.com.br/site/diagrama-de-fases-ver.php?cod=324>>. Acesso em dez. 2017

EISENBARTH, E.; VELTEN, D.; M, M. Biocompatibility of b -stabilizing elements of titanium alloys. **Biomaterials**, v. 25, n. 26, p. 5705–5713, 2004. Acesso em dez. 2017

ESTRADE-SZWARCKOPF, H.; ROUSSEAU, B.; HEROLD, C.; LAGRANGE, P. Sodium-Oxygen graphite intercalation compound: XPS, UPS and STM study. **Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 310, n. 1, p. 231–236, 1998. Acesso em dez. 2017

FERRARIS, S.; VENTURELLO, A.; MIOLA, M.; COCHIS, A.; RIMONDINI, L.; SPRIANO, S. Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration. **Applied Surface Science**, v. 311, p. 279–291, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.05.056>>. Acesso em dez. 2017

FRYBERGER, T. B.; GRANT, J. L.; STAIR, P. C. Adsorption of boron on molybdenum(100) and its effect on chemisorption of carbon monoxide, ethene, propene, and 3,3,3-trifluoropropene. **Langmuir**, v. 3, n. 6, p. 1015–1025, 1 nov. 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/la00078a024>>. Acesso em dez. 2017

GARDNER, S. D.; SINGAMSETTY, C. S. K.; BOOTH, G. L.; HE, G.-R.; PITTMAN JR, C. U. Surface characterization of carbon fibers using angle-resolved XPS and ISS. **Carbon**, v. 33, n. 5, p. 587–595, 1995. Acesso em dez. 2017

GEETHA, M.; SINGH, A. K.; ASOKAMANI, R.; GOGIA, A. K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397–425, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2008.06.004>>. Acesso em dez. 2017

GULATI, K.; RAMAKRISHNAN, S.; AW, M. S.; ATKINS, G. J.; FINDLAY, D. M.; LOSIC, D. Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 449–456, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.004>>. Acesso em dez. 2017

HAO, Y. Q.; LI, S. J.; HAO, Y. L.; ZHAO, Y. K.; AI, H. J. Effect of nanotube diameters on bioactivity of a multifunctional titanium alloy. **Applied Surface Science**, v. 268, p. 44–51, 2013. Acesso em dez. 2017

HERNANDEZ-MONTELONGO, J.; LUCCHESI, E. G.; GONZALEZ, I.; MACEDO, W. A. A.; NASCIMENTO, V. F.; MORAES, A. M.; BEPPU, M. M.; COTTA, M. A. Hyaluronan/chitosan nanofilms assembled layer-by-layer and their antibacterial effect: A study using *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 499–506, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.028>>. Acesso em dez. 2017

HERNANDEZ-MONTELONGO, J.; LUCCHESI, E. G.; NASCIMENTO, V. F.; FRANÇA, C. G.; GONZALEZ, I.; MACEDO, W. A. A.; MACHADO, D.; LANCELLOTTI, M.; MORAES, A. M.; BEPPU, M. M.; COTTA, M. A. Antibacterial and non-cytotoxic ultra-thin polyethylenimine film. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 718–724, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.064>>. Acesso em dez. 2017

HERNÁNDEZ-MONTELONGO, J.; NASCIMENTO, V. F.; MURILLO, D.; TAKETA, T. B.; SAHOO, P.; DE SOUZA, A. A.; BEPPU, M. M.; COTTA, M. A. Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: An antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1–11, 2016a. Acesso em dez. 2017

HERNÁNDEZ-MONTELONGO, J.; NASCIMENTO, V. F.; MURILLO, D.; TAKETA, T. B.; SAHOO, P.; DE SOUZA, A. A.; BEPPU, M. M.; COTTA, M. A. Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: An antibacterial surface for *Xylella fastidiosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1–11, 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.076>>. Acesso em dez. 2017

HO, W. A comparison of tensile properties and corrosion behavior of cast Ti – 7 . 5Mo with c . p . Ti , Ti – 15Mo and Ti – 6Al – 4V alloys. v. 464, n. 112, p. 580–583, 2008. Acesso em dez. 2017

HO, W. F.; CHEN, W. K.; WU, S. C.; HSU, H. C. Structure, mechanical properties, and grindability of dental Ti-Zr alloys. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 10, p. 3179–3186, 2008. Acesso em dez. 2017

HO, W. F.; JU, C. P.; CHERN LIN, J. H. Structure and properties of cast binary Ti-Mo alloys. **Biomaterials**, v. 20, n. 22, p. 2115–2122, 1999. Acesso em dez. 2017

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. Acesso em dez. 2017

HO, W. F.; WU, S. C.; HSU, S. K.; LI, Y. C.; HSU, H. C. Effects of molybdenum content on the structure and mechanical properties of as-cast Ti-10Zr-based alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 3, p. 517–522, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.003>>. Acesso em dez. 2017

HOFMANN, S. Practical surface analysis: state of the art and recent developments in AES, XPS, ISS and SIMS. **Surface and interface analysis**, v. 9, n. 1, p. 3–20, 1986. Acesso em dez. 2017

HOFMANN, S. The contribution of characteristic energy losses in the core-level X-ray photoelectron spectroscopy peaks of TiN and (Ti, Al) N studied by electron energy loss spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 56, n. 2, p. 85–103, 1991. Acesso em dez. 2017

HU, H.; ZHANG, W.; QIAO, Y.; JIANG, X.; LIU, X.; DING, C. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂ coatings on titanium. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 2, p. 904–915, 2012. Acesso em dez. 2017

IKARASHI, Y.; TOYODA, K.; KOBAYASHI, E.; DOI, H.; YONEYAMA, T.; HAMANAKA, H.; TSUCHIYA, T. Improved biocompatibility of titanium-zirconium (Ti-Zr) alloy: Tissue reaction and sensitization to Ti-Zr alloy compared with pure Ti and Zr in rat implantation study. **Nippon Kinzoku Gakkaishi/Journal of the Japan Institute of Metals**, v. 71, n. 4, p. 395–401, 2007. Acesso em dez. 2017

INDIRA, K.; MUDALI, U. K.; NISHIMURA, T.; RAJENDRAN, N. A Review on TiO₂ Nanotubes: Influence of Anodization Parameters, Formation Mechanism, Properties, Corrosion Behavior, and Biomedical Applications. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 1, n. 4, p. 28, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40735-015-0024-x>>. Acesso em dez. 2017

KOBAYASHI, E.; MATSUMOTO, S.; DOI, H.; YONEYAMA, T.; HAMANAKA, H. Mechanical properties of the binary titanium-zirconium alloys and their potential for biomedical materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 29, n. 8, p. 943–950, 1995. Acesso em dez. 2017

KOGAN, G.; ŠOLTÉS, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. **Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications** *Biotechnology Letters*, 2007. . Acesso em dez. 2017

KULKARNI, M.; PATIL-SEN, Y.; JUNKAR, I.; KULKARNI, C. V.; LORENZETTI, M.; IGLIČ, A. Wettability studies of topologically distinct titanium surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 129, p. 47–53, 2015. Acesso em dez. 2017

KUMMER, K. M.; TAYLOR, E. N.; DURMAS, N. G.; TARQUINIO, K. M.; ERCAN, B.; WEBSTER, T. J. Effects of different sterilization techniques and varying anodized TiO₂ nanotube dimensions on bacteria growth. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 101 B, n. 5, p. 677–688, 2013. Acesso em dez. 2017

KUZNETSOV, M. V.; ZHURAVLEV, J. F.; GUBANOV, V. A. XPS analysis of adsorption of oxygen molecules on the surface of Ti and TiN_x films in vacuum. **Journal of electron spectroscopy and related phenomena**, v. 58, n. 3, p. 169–176, 1992. Acesso em dez. 2017

LAHEURTE, P.; PRIMA, F.; EBERHARDT, A.; GLORANT, T.; WARY, M.; PATOOR, E. Mechanical properties of low modulus β titanium alloys designed from the electronic approach. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 3, n. 8, p. 565–573, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2010.07.001>>. Acesso em dez. 2017

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2533–2541, 2007. Acesso em dez. 2017

LEE, Y. Bin; SHIN, Y. M.; LEE, J. hye; JUN, I.; KANG, J. K.; PARK, J. C.; SHIN, H. Polydopamine-mediated immobilization of multiple bioactive molecules for the development of functional vascular graft materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 33, p. 8343–8352, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.011>>. Acesso em dez. 2017

LI, Y.; WONG, C.; XIONG, J.; HODGSON, P.; WEN, C. Cytotoxicity of titanium and titanium alloying elements. **Journal of dental research**, v. 89, n. 5, p. 493–7, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332331>>. Acesso em dez. 2017

LIU, X.; HUANG, A.; DING, C.; CHU, P. K. Bioactivity and cytocompatibility of zirconia (ZrO₂) films fabricated by cathodic arc deposition. **Biomaterials**, v. 27, n. 21, p. 3904–3911, 2006. Acesso em dez. 2017

LONG, M.; RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. **Biomaterials**, v. 19, p. 1621–1639, 1998. Acesso em dez. 2017

MARTINS, T. D.; BATAGLIOLI, R. A.; TAKETA, T. B.; VASCONCELLOS, F. D. C.; BEPPU, M. M. Surface modification of polyelectrolyte multilayers by high radio frequency air plasma treatment. **Applied Surface Science**, v. 329, p. 287–291, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.12.010>>. Acesso em dez. 2017

NIINOMI, M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 1, n. 1, p. 30–42, 2008. Acesso em dez. 2017

OLIVEIRA, N. T. C. ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE LIGAS Ti-Mo DE INTERESSE PARA BIOMATERIAIS ELECTROCHEMICAL STUDIES ON Ti-Mo ALLOYS OF INTEREST TO BIOMATERIALS. v. 26, p. 1–7, 2007. Acesso em dez. 2017

OLIVEIRA, N. T. C.; ALEIXO, G.; CARAM, R.; GUASTALDI, A. C. Development of Ti-Mo alloys for biomedical applications: Microstructure and electrochemical characterization. **Materials Science and Engineering A**, v. 452–453, p. 727–731, 2007. Acesso em dez. 2017

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, n. 3, p. 35004, 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1088/1468-6996/9/3/035004>>. Acesso em dez. 2017

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂ coatings on titanium. **Nano-Micro Letters**, v. 9, n. 3, p. 35004, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>>. Acesso em dez. 2017

PARAMASIVAM, I.; JHA, H.; LIU, N.; SCHMUKI, P. A Review of Photocatalysis using Self-organized TiO₂ Nanotubes and Other Ordered Oxide Nanostructures. n. 20, p. 3073–3103, 2012. Acesso em dez. 2017

PATEL, N.; GOHIL, P. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 2, n. 4, p. 91–101, 2012. Acesso em dez. 2017

PAULA-RAMOS, L.; EDUARDO, C.; CAMARGO, D.; MELLO, R.; THEODORO, L. N.; OLIVEIRA, F. E. De; BRITO, G. N. B.; JUNQUEIRA, J. C.; OLAVO, A.; JORGE, C.; OLIVEIRA, L. D. De. Klebsiella pneumoniae Planktonic and Biofilm Reduction by Different Plant Extracts : In Vitro Study. v. 2016, 2016. Acesso em dez. 2017

PENG, Z.; NI, J.; ZHENG, K.; SHEN, Y.; WANG, X.; HE, G.; JIN, S.; TANG, T. Dual effects and mechanism of TiO₂ nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1/2 cell adhesion. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3093–3105, 2013. Acesso em dez. 2017

PERRY, S. S.; AGER III, J. W.; SOMORJAI, G. A.; MCCLELLAND, R. J.; DRORY, M. D. Interface characterization of chemically vapor deposited diamond on titanium and Ti-6Al-4V. **Journal of applied physics**, v. 74, n. 12, p. 7542–7550, 1993. Acesso em dez. 2017

PETERS, M. **Titanium and Titanium Alloys Edited by**. [s.l: s.n.]v. 1

PILLEUX, M. E.; GRAHMANN, C. R.; FUENZALIDA, V. M. Hydrothermal Strontium Titanate Films on Titanium: An XPS and AES Depth-Profiling Study. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 77, n. 6, p. 1601–1604, 1994. Acesso em dez. 2017

PITT, W. G.; MORRIS, R. N.; MASON, M. L.; HALL, M. W.; LUO, Y.; PRESTWICH, G. D. Attachment of hyaluronan to metallic surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 68A, n. 1, p. 95–106, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.10170>>. Acesso em dez. 2017

PODPORSKA-CARROLL, J.; PANAITESCU, E.; QUILTY, B.; WANG, L.; MENON, L.; PILLAI, S. C. Antimicrobial properties of highly efficient photocatalytic TiO₂nanotubes. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 176–177, p. 70–75, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.03.029>>. Acesso em dez. 2017

POPAT, K. C.; ELTGROTH, M.; LATEMPA, T. J.; GRIMES, C. A.; DESAI, T. A. Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. **Biomaterials**, v. 28, n. 32, p. 4880–4888, 2007. Acesso em dez. 2017

RANGEL, a. L. R.; ESCADA, a. L. a.; ALVES CLARO, a. P. R. Surface modification of the Ti–15Mo alloy by TiO₂ nanotubes growth for dental applications. **Dental Materials**, v. 29, n. 2, p. e95–e96, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109564113003916>>. Acesso em dez. 2017

RHO, J.-Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering & Physics**, v. 20, n. 2, p. 92–102, mar. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350453398000071>>. Acesso em dez. 2017

SAIDIN, S.; CHEVALLIER, P.; ABDUL KADIR, M. R.; HERMAWAN, H.; MANTOVANI, D. 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. Acesso em dez. 2017

SEAH, M. P. XPS reference procedure for the accurate intensity calibration of electron spectrometers—results of a BCR intercomparison co-sponsored by the VAMAS SCA TWA. **Surface and interface analysis**, v. 20, n. 3, p. 243–266, 1993. Acesso em dez. 2017

SIOW, K. S.; BRITCHER, L.; KUMAR, S.; GRIESSER, H. J. Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review. **Plasma Processes and Polymers**, v. 3, n. 6–7, p. 392–418, 2006. Acesso em dez. 2017

SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A.; KAUS, N. H. M.; ANN, L. C.; BAKHORI, S. K. M.; HASAN, H.; MOHAMAD, D. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 3, p. 219–242, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>>. Acesso em dez. 2017

SOBIESZCZYK, S.; ZIELIŃSKI, A. Coatings in Arthroplasty: Review Paper. **Advances in Materials Sciences**, v. 8, n. 4, 2008. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/adms.2008.8.issue-4/v10077-008-0049-7/v10077-008-0049-7.xml>>. Acesso em dez. 2017

SODHI, R. N. S.; WENINGER, A.; DAVIES, J. E.; SREENIVAS, K. X-ray photoelectron spectroscopic comparison of sputtered Ti, Ti6Al4V, and passivated bulk metals for use in cell culture techniques. **Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films**, v. 9, n. 3, p. 1329–1333, 1991. Acesso em dez. 2017

SUKEDAI, E.; YOSHIMITSU, D.; MATSUMOTO, H.; HASHIMOTO, H.; KIRITANI, M. β to ω phase transformation due to aging in a Ti-Mo alloy deformed in impact compression. **Materials Science and Engineering A**, v. 350, n. 1–2, p. 133–138, 2003. Acesso em dez. 2017

VICENTE, F. B.; CORREA, D. R. N.; DONATO, T. A. G.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; BUZALAF, M. A. R.; GRANDINI, C. R. The influence of small quantities of oxygen in the structure, microstructure, hardness, elasticity modulus and cytocompatibility of Ti-Zr alloys for dental applications. **Materials**, v. 7, n. 1, p. 542–553, 2014. Acesso em dez. 2017

VICENTINI, D. S.; SMANIA, A.; LARANJEIRA, M. C. M. Chitosan / poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. **Materials Science & Engineering C**, v. 30, n. 4, p. 503–508, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.026>>. Acesso em dez. 2017

WIERTZ, V.; BERTRAND, P. Identification of the N-containing functionalities introduced at the surface of ammonia plasma treated carbon fibres by combined ToF-SIMS and XPS. 1998. Acesso em dez. 2017

YASUDA, K.; SCHMUKI, P. Formation of Self-Organized Zirconium Titanate Nanotube Layers by Alloy Anodization. **Advanced Materials**, v. 19, n. 13, p. 1757–1760, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200601912>>. Acesso em dez. 2017

ZHANG, L.; JIANG, Y.; DING, Y.; POVEY, M.; YORK, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). p. 479–489, 2007. Acesso em dez. 2017

ZHANG, L.; NING, C.; ZHOU, T.; LIU, X.; YEUNG, K. W. K.; ZHANG, T.; XU, Z.; WANG, X.; WU, S.; CHU, P. K. Polymeric nanoarchitectures on Ti-based implants for antibacterial applications. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 20, p. 17323–17345, 2014. Acesso em dez. 2017

ZHAO, L.; MEI, S.; WANG, W.; CHU, P. K.; WU, Z.; ZHANG, Y. The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2055–2063, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.103>>. Acesso em dez. 2017

ZHAO, X.; NIINOMI, M.; NAKAI, M.; HIEDA, J. Beta type Ti-Mo alloys with changeable Young's modulus for spinal fixation applications. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 5, p. 1990–1997, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.02.004>>. Acesso em dez. 2017

ZHAO, X.; NIINOMI, M.; NAKAI, M.; ISHIMOTO, T.; NAKANO, T. Development of high Zr-containing Ti-based alloys with low Young's modulus for use in removable implants. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 7, p. 1436–1444, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2011.05.013>>. Acesso em dez. 2017

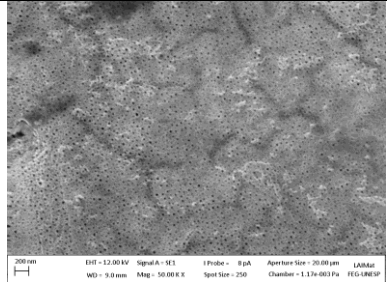
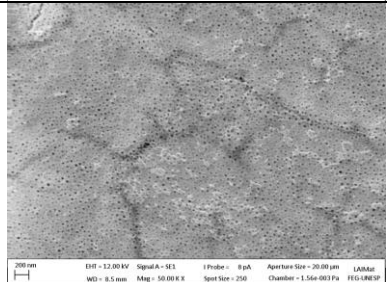
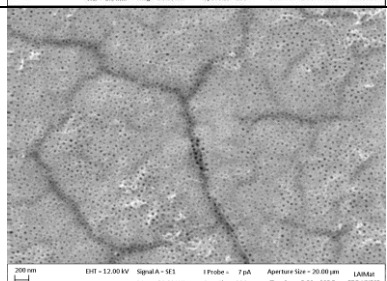
ZHONG, S.; LUO, R.; WANG, X.; TANG, L.; WU, J.; WANG, J.; HUANG, R.; SUN, H.; HUANG, N. Effects of polydopamine functionalized titanium dioxide nanotubes on endothelial cell and smooth muscle cell. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 553–560, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.030>>. Acesso em dez. 2017

ZHOU, Y. L.; NIINOMI, M.; AKAHORI, T.; FUKUI, H.; TODA, H. Corrosion resistance and biocompatibility of Ti-Ta alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering A**, v. 398, n. 1–2, p. 28–36, 2005. Acesso em dez. 2017

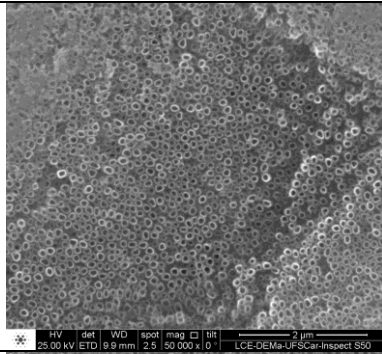
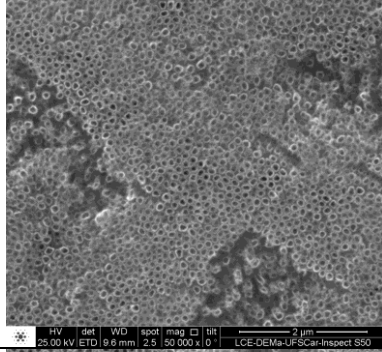
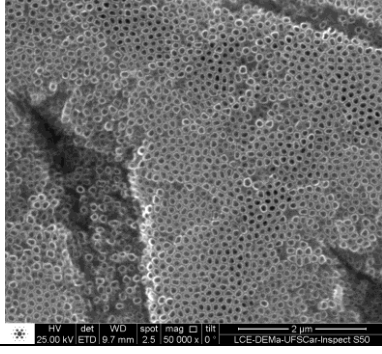
ZHU, Y.; MENG, Q.; GUO, S.; QI, L.; XIAO, W.; PING, D.; ZHAO, X. Anomalous phase stability of surface and interior in a metastable Ti-Nb-Zr alloy. **Materials Letters**, v. 169, p. 210–213, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2016.01.145>>. Acesso em dez. 2017

APENDICE

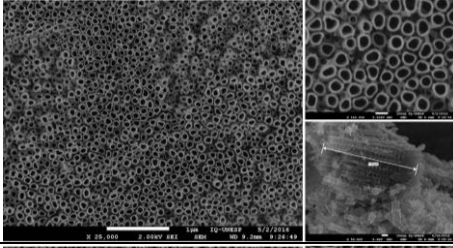
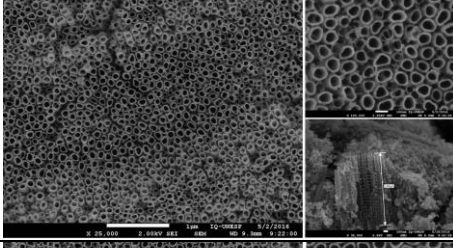
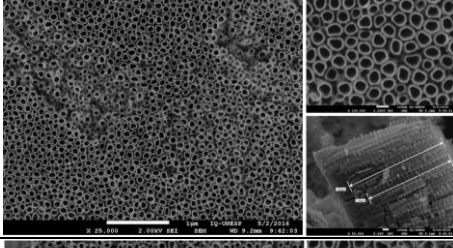
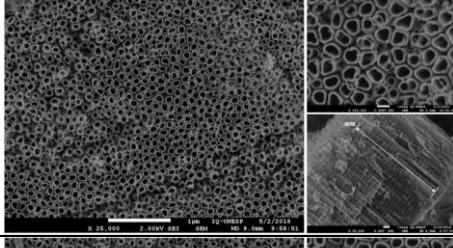
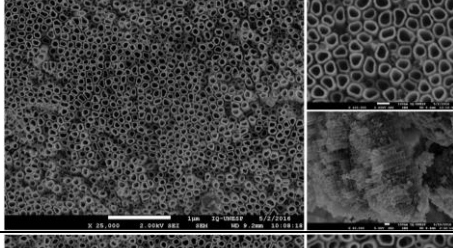
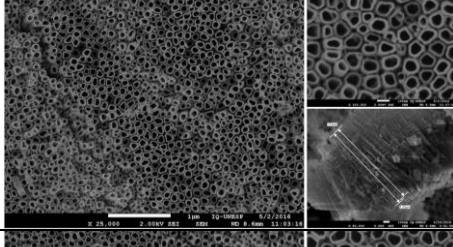
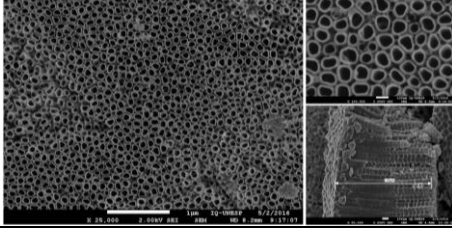
Quadro 2 - Parâmetros para oxidação anódica da liga Ti15Zr

Potencial [V]		Eletrólito	Tempo [h]	Calcinação [°C]	Superfície	Observações
20 V		Água DI (90% V) Glicerol (10% V)+NH ₄ F (2,5 g/L)	6	450		Diâmetro dos nanotubos 64,9 nm
			12			Diâmetro dos nanotubos 63,1 nm
			24			Diâmetro dos nanotubos 56,8 nm

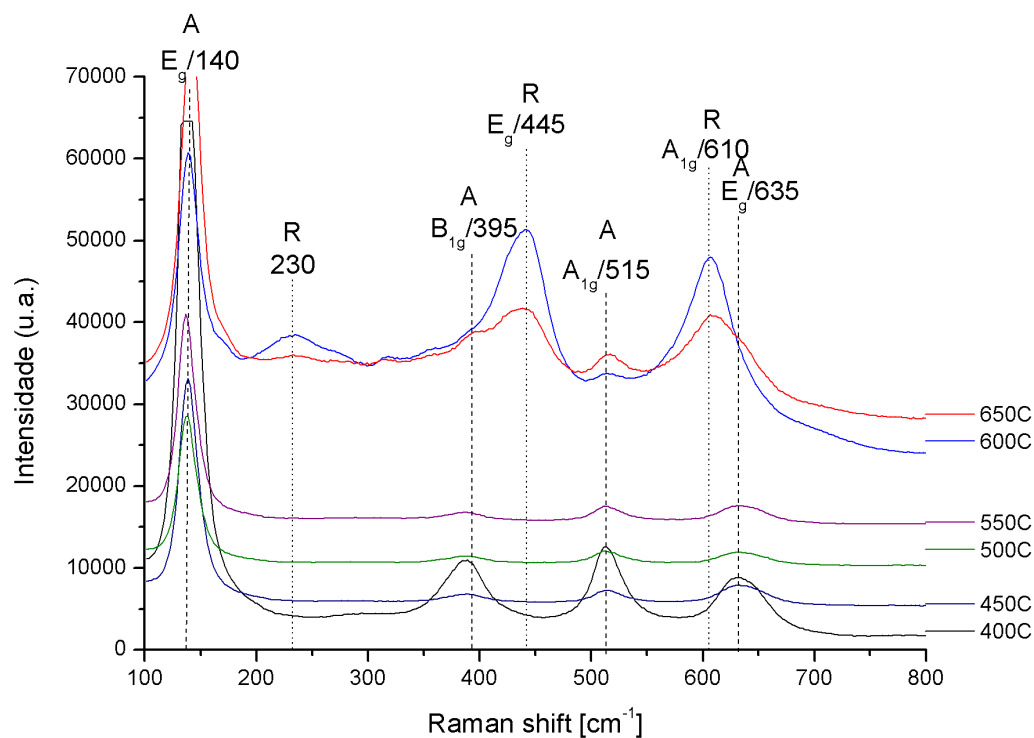
Quadro 3 - Parâmetros para oxidação anódica da liga Ti15Zr

Potencial [V]	Eletrólito	Tempo [h]	Calcinação [°C]	Superfície	Observações
20 V	Água DI (50% V) Glicerol (50% V)+NH ₄ F (2,7 g/L)	6	450		Diâmetro dos nanotubos 86,8 nm
		12			Diâmetro dos nanotubos 88,5 nm
		24			Diâmetro dos nanotubos 94,1 nm

Quadro 4- Influencia da Calcinação na formação dos nanotubos

Potencial [V]	Eletrólito	Tempo [h]	Calcinação [°C]	Superfície	Observações
20 V	Água DI (50% V) + Glicerol (50% V)+ NH ₄ F (2,7 g/L)	6	400		Diâmetro 87,9 nm Espessura 1550 nm
			450		Diâmetro 80,6 nm Espessura 1370 nm
			500		Diâmetro 92,4 nm Espessura 1460 nm
			550		Diâmetro 91,9 nm Espessura 1450 nm
			600		Diâmetro 91,5 nm Espessura 1370 nm
			650		Diâmetro 86,4 nm Espessura 1510 nm
			Sem		Diâmetro 90,8 nm Espessura 1410 nm

Quadro 5 - Espectroscopia Raman da superfície de nanotubos calcinados em diferentes temperaturas. Os picos referentes a estrutura do TiO₂ representando a fase anatase (A) e ao rutilo (R).



Quadro 6 - Espectro da difração de raios-X das amostras calcinadas em diferentes temperaturas. A letra S indicam os picos referente ao substrato (Ti15Zr), enquanto as letras A e R representam os picos referente as fases Anatase e Rutilo do TiO₂.

