

DANIELLE DUQUE DOMINGUES

**Incorporação de óxido de ferro em superfície nanoporosa de TiO_2 crescida sobre a liga
 $\text{Ti}_{10}\text{Mo}_8\text{Nb}$ visando aplicação biomédica**

Danielle Duque Domingues

Incorporação de óxido de ferro em superfície nanoporosa de TiO_2 crescida sobre a liga $\text{Ti}_{10}\text{Mo}_8\text{Nb}$ visando aplicação biomédica

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

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angel Ramirez Gil

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Rosifini Alves Claro

D671i Domingues, Danielle Duque
Incorporação de óxido de ferro em superfície nanoporosa de TiO₂ crescida sobre a liga Ti10Mo8Nb visando aplicação biomédica / Danielle Duque Domingues – Guaratinguetá, 2019.
93 f : il.
Bibliografia: f. 83-91

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2019.
Orientador: Prof. Dr. Miguel Angel Ramirez Gil
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Ana Paula Rosifini Alves Claro

1. Materiais biomédicos. 2. Ligas de titânio. 3. Óxido de ferro.
I. Título.

CDU 620.1(043)

DANIELLE DUQUE DOMINGUES

ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
“MESTRE EM ENGENHARIA MECÂNICA”

PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
CURSO: MESTRADO

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO



Prof. Dr. Ivonete Ávila
Coordenadora

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. MIGUEL ANGEL RAMIREZ GIL
Orientador / UNESP-FEG



Dra. ANA LÚCIA DO AMARAL ESCADA
UNESP/FEG

Participou por V.C

Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO
UNESP/FEB

DADOS CURRICULARES

DANIELLE DUQUE DOMINGUES

NASCIMENTO	11.06.1990 – Pindamonhangaba / SP
FILIAÇÃO	Manoel Wagner Guedes Domingues Maria Wilza Gonçalves Duque Domingues
2010/2016	Curso de Graduação Engenharia de Materiais Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
2017/2019	Curso de Pós-Graduação Engenharia Mecânica, nível de Mestrado Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedico este trabalho aos meus pais por todo o apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador *Prof. Dr. Miguel Angel Ramirez Gil* por todo o incentivo e apoio;
à minha coorientadora *Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro* pela motivação e dedicação;

aos amigos do Grupo de Biomateriais pelo apoio e ajuda;

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

ao *Prof. Dr. Alexandre Zirpoli Simões* por toda a ajuda durante o desenvolvimento do trabalho;

ao *Prof. Dr. João Paulo Barros Machado* do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais pela colaboração nas caracterizações e auxílio na discussão dos resultados;

ao mestre *Luis Felipe de Paula Santos* pela realização do TG;

ao Departamento de Engenharia de Materiais da USP/EEL pela realização do DRX;

aos alunos de pós-graduação *Reginaldo Toshihiro Konatu* e *João Pedro Aquiles Carobolante* pela colaboração no processamento da liga;

aos meus amigos da pós-graduação *Adelvam Pereira Junior* e *Celso Bortolini Júnior* pelo companheirismo e suporte durante o mestrado;

ao grupo do *Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho* da Faculdade de Ciências – UNESP/Campus Bauru pela colaboração na funcionalização da superfície das amostras;

à mestre *Bruna Pimentel* da Faculdade de Odontologia – UNESP/ Campus Araraquara pela colaboração na avaliação biológica das amostras;

à CAPES pela bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

O titânio e as suas ligas são utilizados em aplicações biomédicas devido às suas excelentes propriedades, tais como resistência mecânica e biocompatibilidade. As técnicas de modificação de superfície são utilizadas nestas ligas para alterar as propriedades de superfície, aumentar a osseointegração e evitar falhas em implantes. Além destas técnicas, a incorporação de nanopartículas na superfície do implante têm sido grande aliada dos biomateriais, em especial às do óxido de ferro, devido às suas propriedades físico-químicas, sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. O objetivo dessa dissertação foi propor método de incorporação de óxido de ferro na superfície nanoporosa da liga experimental Ti10Mo8Nb modificada por oxidação anódica, visando aplicações biomédicas. Os lingotes da liga experimental Ti10Mo8Nb foram obtidos a partir da fusão dos metais puros em forno a arco voltaico. A anodização foi realizada para obtenção das nanoestruturas de TiO₂ (tensão de 20 V por 3 h), resultando em diâmetro interno dos nanoporos igual a aproximadamente 24 nm. A síntese do óxido de ferro foi realizada usando o método dos precursores poliméricos, sendo avaliado o comportamento reológico (viscosidade de 22,65 mPa.s) e a temperatura de cristalização para formação de nanopartículas de óxido de ferro. A partir da difratometria de raios X e da microscopia eletrônica de varredura, a temperatura de calcinação mais adequada para a formação da fase pura de hematita foi 600°C. A incorporação do óxido de ferro na superfície da liga foi realizado por duas técnicas: imersão e *spin coating*, de maneira que o segundo método apresentou deposição uniforme. O *spin coating* foi realizado com 3 e 5 camadas de deposição de óxido de ferro, concluindo-se que 5 camadas é mais adequado por não apresentar delaminações.. As amostras foram funcionalizadas com dois tipos de compostos orgânicos: ácido 3-(4-aminofenil)propiônico (APPA) e ácido 3-mercaptopropiônico (MPA).

PALAVRAS-CHAVE: Biomateriais. Óxido de titânio. Ligas de titânio. Oxidação anódica. Incorporação de óxido de ferro.

ABSTRACT

Titanium and its alloys are used in biomedical applications because of their excellent properties, such as mechanical resistance and biocompatibility. Surface modification techniques are used to alter the surface properties, increase osseointegration and avoid implant failure. Beside these techniques, nanoparticles incorporation on implant surface are great biomaterials allies, specially iron oxides, due to their physicochemical properties, biocompatibility and biodegradability. The objective of this dissertation was to propose a method of iron oxide incorporation on the surface of experimental alloy Ti10Mo8Nb modified by anodization. The ingots of experimental alloy Ti10Mo8Nb were obtained from melting pure metals in an arc furnace. Anodization process was performed to obtain the TiO₂ nanostructures, with internal diameter 24 nm. Iron oxide synthesis was carried out using the method of the polymeric precursors, assessing rheological behavior (22,65 mPa.s viscosity) and crystallization temperature ideal to produce iron oxide nanoparticles. Results from X Ray Diffratogram and Scanning Electron Microscopy presented that the most adequated annealing temperature to pure phase hematite was 600°C. Iron oxide incorporation on alloy surface was performed by immersion and spin coating, and in the second method the deposition was uniform and widespread. Spin coating was performed with 3 and 5 layers of iron oxide deposition, implying that with 5 layers is most appropriate because it does not have delamination. After that, the alloys were annealed and functionalized with 2 types of organic compounds: APPA and MPA.

KEYWORDS: Biomaterials. Titanium oxide. Titanium alloys. Anodic oxidation. Iron oxide deposition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos tipos de materiais biomédicos.....	23
Figura 2 - Resposta do corpo humano ao implante em diferentes intervalos de tempo e reações ocorrendo durante a adesão celular.....	25
Figura 3 – a) Esquema de prótese dentária com estrutura porosa do osso; b) Nanoporos obtidos após anodização na superfície da liga Ti10Mo8Nb.....	26
Figura 4 – a) Principais causas de falhas em implantes; b) Efeitos de falhas em implantes a curto e longo prazo.	28
Figura 5 - O titânio é um elemento alotrópico, apresentando estrutura hexagonal compacta (HC) e, acima de 883°C, estrutura cúbica de corpo centrado (CCC).	29
Figura 6 - Aplicações biomédicas do titânio e suas ligas: a) implante dentário rosqueado, b) ligamento artificial de joelho, c) implante coxo-femoral, d) enxerto ósseo (tela de titânio substituindo região do crânio) e e) exemplos de pinos e parafusos de ligas de titânio utilizados em implantes em geral.	31
Figura 7 - Micrografia óptica da liga Ti10Mo8Nb, apresentando fase β	33
Figura 8 - Desenho esquemático da célula de anodização do Ti.	34
Figura 9 – Processo de anodização e possíveis morfologias anódicas: I) Superfície metálica; II) Formação de óxidos anódicos compactos; III) Nanotubos e nanoporos; IV) Formação desorganizada de nanotubos; V) Camadas ordenadas de nanotubos.....	36
Figura 10 – Possível modelo esquemático da ligação de moléculas bifuncionais: a) APPA e b) MPA.	42
Figura 11 – Metais utilizados para preparo da liga: (a) titânio, (b) molibdênio e (c) nióbio. ...	46
Figura 12 – Forno a arco voltaico utilizado para a obtenção da liga Ti10Mo8Nb.....	47
Figura 13 – a) Célula empregada na anodização das amostras e b) Esquema da célula com a fonte.	49
Figura 14 – a) Solução no agitador magnético e b) Solução com viscosidade desejada.	50
Figura 15 – Equipamento utilizado para verificar a viscosidade da resina polimérica - viscosímetro Brookfield/ DV-II+Pro.	51
Figura 16 – Fluxograma do procedimento experimental para obtenção do óxido de ferro pelo método dos precursores poliméricos (método Pechini).	53
Figura 17 – Deposição por imersão: amostras da liga experimental de Ti10Mo8Nb imersas em solução de óxido de ferro.	54
Figura 18 – a) Equipamento do <i>spin coating</i> e b) Compressor.	55

Figura 19 – Funcionalização das amostras da liga Ti10Mo8Nb anodizadas e incorporadas com óxido de ferro por meio do método <i>spin coating</i> (5 camadas).	56
Figura 20 – Fluxograma da metodologia utilizada nesse trabalho.	62
Figura 21 - Difratoograma do <i>bulk</i> da liga Ti10Mo8Nb após oxidação anódica.	63
Figura 22 – Micrografias da superfície da liga TMN após anodização em eletrólito formado por 2,7 g de NH ₄ F a cada litro da solução glicerol/água (1:1, em volume), sob tensão de 20V durante 3h: a) Ampliação 50kx e b) Ampliação 200kx com medições dos nanoporos.	64
Figura 23 – Resultado da análise termogravimétrica (TG) do pó cerâmico processado pelo método dos precursores poliméricos (método Pechini), com temperatura até 1000°C.	65
Figura 24 - Difratoogramas dos pós cerâmicos obtidos pelo método dos precursores poliméricos (método Pechini), submetidos a tratamentos térmicos a (a) 500°C, (b) 550°C e (c) 600°C.	66
Figura 25 – Micrografias dos nanopós processados pelo método dos precursores poliméricos, após tratamentos térmicos a: a) 500°C, b) 550°C e c) 600°C, ampliação de 150kx.	67
Figura 26 – Resultados obtidos na análise do ângulo de contato, por meio do método de gota sésil, considerando os meios ar, resina polimérica e superfície da liga Ti10Mo8Nb.	69
Figura 27 - Espectros Raman: a) TMN anodizada, b) TMN + óxido de ferro (5 camadas, <i>spin coating</i>) e c) funcionalizada com APPA em comparação à MPA.	70
Figura 28 – Micrografias para as amostras da liga TMN anodizadas e depositadas com hematita por meio de imersão, com diferentes tratamentos térmicos: a) 500°C e b) 600°C.	72
Figura 29 – Micrografias para as amostras da liga TMN anodizadas e depositadas com óxido de ferro por meio do <i>spin coating</i> , ambos a 5000 rpm, porém com quantidades diferentes de camadas: a) 3 camadas e b) 5 camadas.	72
Figura 30 - Micrografias das amostras riscadas da liga experimental Ti10Mo8Nb anodizadas, com deposição de óxido de ferro pelo método de <i>spin coating</i> , sendo a) 3 camadas e b) 5 camadas. Vista de cima, ambas com magnificação de 80 kx.	73
Figura 31 - Micrografias das amostras riscadas da liga experimental Ti10Mo8Nb anodizadas, com deposição de óxido de ferro pelo método de <i>spin coating</i> , sendo a) 3 camadas e b) 5 camadas. Vista transversal, ambas com magnificação de 100 kx.	74
Figura 32 – Micrografias com exemplos de delaminações ao longo da superfície da amostra da liga Ti10Mo8Nb anodizada, depositada com óxido de ferro (3 camadas), funcionalizadas com a) APPA e b) MPA.	74
Figura 33 – Micrografias da liga TMN anodizada após deposição de óxido de ferro por <i>spin coating</i> , 5 camadas, funcionalizadas com a) APPA e b) MPA, sendo 1) camada de nanoporos de TiO ₂ , 2) camada de óxido de ferro e 3) camada com polímero funcionalizado.	75

Figura 34 – Resultados obtidos na análise do ângulo de contato, por meio do método de gota séssil, considerando os meio ar, água destilada e superfície da liga Ti10Mo8Nb. 1) TMN lixada, 2) TMN + calcinada 3) TMN + óxido de ferro, 4) TMN + APPA e 5) TMN + MPA.	76
Figura 35 - Valores médios de Log ₁₀ (UFC/mL) de <i>Escherichia coli</i> aderida aos espécimes de titânio com tratamento de superfície (TMN + óxido de ferro) e com funcionalização (MPA, APPA). As barras de erro indicam o desvio padrão (n=9).....	78
Figura 36 - Valores absorvância (492nm) do ensaio de XTT das células de <i>E. coli</i> aderidas nas superfícies de titânio. Linha interna: mediana; Limite superior da caixa: 3º quartil; Limite inferior da caixa: 1º quartil; Barras de erro: valores mínimo e máximo (n=6).	78
Figura 37 – Micrografias células <i>E. coli</i> aderidas nas superfícies. Marcação realizada com iodeto de propídio (células em vermelho) e Syto9 (células em verde): a) Liga TMN + óxido de ferro, b) Liga funcionalizada - MPA, c) Liga funcionalizada - APPA. Magnificação 40x.	79
Figura 38 - Micrografias células de <i>E. coli</i> aderidas nas superfícies: a) e b) Liga TMN + óxido de ferro, c) e d) Liga funcionalizada com MPA, e) e f) Liga funcionalizada com APPA. Magnificação 2 kx (a, c e e); 6 kx (b, d e f).	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros empregados na anodização da liga Ti10Mo8Nb.....	48
Tabela 2 - Parâmetros de tratamento térmico dos pós cerâmicos.....	52
Tabela 3 - Parâmetros utilizados na medição do ângulo de contato das amostras, considerando ar-resina polimérica-superfície da amostra. Com os grupos: 1) TMN lixada, 2) TMN anodizada e 3) TMN calcinada.	58
Tabela 4 - Parâmetros do ângulo de contato, considerando ar-água destilada-superfície da amostra. Com os grupos: 1) TMN lixada, 2) TMN calcinada, 3) TMN + óxido de ferro (3 camadas), 4) TMN + óxido de ferro (5 camadas), 5) TMN + APPA e 6) TMN + MPA.	58
Tabela 5 - Massas molares dos reagentes do método dos precursores poliméricos.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TMN	Liga Ti ₁₀ Mo ₈ Nb
APPA	Ácido 3- 4(aminofenil)propiónico
MPA	Ácido 3-mercaptopropiónico
DRX	Difratometria de raios X
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
TG	Análise Termogravimétrica
TT	Tratamento Térmico
FEG	Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
EEL	Escola de Engenharia de Lorena
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XTT	Sodium 3'-1-[(phenylamino)-carbonyl]-3-4-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	21
2.1.1	Biomateriais	21
2.1.2	Biocompatibilidade	24
2.1.3	Osseointegração	24
2.1.4	Implantes	27
2.2	TITÂNIO E SUAS LIGAS	29
2.3	MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE – OXIDAÇÃO ANÓDICA	33
2.4	ÓXIDO DE FERRO	37
2.4.1	Hematita	37
2.4.2	Método dos precursores poliméricos (método Pechini)	38
2.4.3	Incorporação de óxido de ferro	39
2.5	FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA	40
2.6	ANÁLISE DA ADESÃO DE BACTÉRIA	43
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	LIGA Ti10Mo8Nb	46
4.1.1	Processamento da liga e obtenção das amostras	46
4.1.2	Preparação do substrato e oxidação anódica	48
4.2	ÓXIDO DE FERRO	49
4.2.1	Síntese do óxido de ferro	49
4.2.2	Análise do comportamento reológico da resina polimérica	50
4.2.3	Obtenção do pó cerâmico (óxido de ferro)	51
4.3	INCORPORAÇÃO DE ÓXIDO DE FERRO NA SUPERFÍCIE DA LIGA Ti10Mo8Nb	53
4.3.1	Incorporação do óxido de ferro por imersão	53
4.3.2	Deposição do óxido de ferro por <i>spin coating</i>	55
4.4	DEPOSIÇÃO DAS MOLÉCULAS ORGÂNICAS NA SUPERFÍCIE DA LIGA	56
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	57

4.5.1	Caracterização da superfície da liga TMN	57
4.5.2	Caracterização do pó cerâmico	59
4.6	ANÁLISE DA ADESÃO DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA	59
4.6.1	Microorganismo e condições de cultivo	59
4.6.2	Ensaio de adesão	60
4.6.3	Microscopia de fluorescência confocal a laser	60
4.6.4	Microscopia eletrônica de varredura	61
4.6.5	Análise estatística	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA LIGA Ti ₁₀ Mo ₈ Nb ANODIZADA	63
5.1.1	Difratometria de raios X (DRX)	63
5.1.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	63
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO PÓ CERÂMICO	64
5.2.1	Análise termogravimétrica (TG)	64
5.2.2	Difratometria de raios X (DRX)	66
5.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA RESINA POLIMÉRICA	68
5.3.1	Análise do comportamento reológico (viscosidade)	68
5.3.2	Análise do ângulo de contato (molhabilidade)	68
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA	69
5.4.1	Espectroscopia Raman	69
5.4.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	72
5.4.3	Análise do ângulo de contato (molhabilidade)	76
5.5	ANÁLISE DA ADESÃO DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA	77
5.5.1	Ensaio de adesão	77
5.5.2	Microscopia de fluorescência confocal a laser	79
5.5.3	Microscopia eletrônica de varredura	79
6	CONCLUSÃO	81
7	TRABALHOS FUTUROS	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A - Cálculos utilizados para pesagem dos reagentes utilizados no método dos precursores poliméricos (método Pechini)	92

1 INTRODUÇÃO

Biomaterial é toda substância ou combinação de substâncias, exceto fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (CHEN; THOUAS, 2015). Os biomateriais possuem como característica essencial a biocompatibilidade, que é uma gama de processos envolvendo diferentes interações entre o material e o tecido. Um material biocompatível possui habilidade em desempenhar uma função específica no organismo sem provocar inflamações indesejadas ou efeitos tóxicos aos sistemas biológicos (KIRMANIDOU et al., 2016).

Biomateriais metálicos, tais como aço inoxidável, cobalto-cromo e ligas de titânio, têm sido estudados com o intuito de substituir tecidos duros devido às excelentes propriedades. Em particular, a superfície das ligas de titânio tem apresentado excelente biocompatibilidade e osseointegração, resultando na ligação celular e fixação do implante (HATAMLEH et al., 2018). O sucesso de um implante de titânio depende da interação entre o biomaterial e o tecido vivo. Após a implantação, a superfície é condicionada a fluidos corpóreos que modulam a atividade celular no tecido ao redor do implante (HATAMLEH et al., 2018; MARINUCCI et al., 2006).

Embora as propriedades acima citadas sejam necessárias para um material visando aplicação biomédica, os implantes metálicos ao serem inseridos no corpo humano também dependem de outras propriedades específicas de superfície para obterem êxito, tais como energia de superfície, composição química, hidrofiliabilidade, morfologia e rugosidade (ALVES CLARO et al., 2018; MARINUCCI et al., 2006). Com isso, estudos de modificação de superfície das ligas de titânio visam melhorar essas propriedades.

Segundo Hatamleh e autores (2018), os tratamentos de superfície envolvem diversas metodologias que possuem três efeitos principais: proteção (por exemplo a resistência à corrosão e ao desgaste), decorativo (por exemplo coloração) e funcional (por exemplo biocompatibilidade). Ao modificar a superfície da liga, podem ser obtidas as propriedades desejadas para aplicação biomédica. A anodização é uma técnica de modificação de superfície que acelera o processo de formação da camada de TiO_2 , esta que é característica do titânio e suas ligas por ser formada espontaneamente, chamada de camada passiva (KHUDHAIR et al., 2016; KIRMANIDOU et al., 2016; REGONINI et al., 2013). A formação dessa camada ocorre quando o titânio está em contato com o oxigênio e esta camada retarda a dissolução de íons e outras relações com os tecidos ao redor do material (JIN et al., 2016).

O desenvolvimento de novas superfícies pode melhorar a performance dos implantes de Ti de maneira geral, principalmente no que diz respeito à aceitação do material pelo corpo humano, ao tempo de cicatrização após a implantação, à integridade do implante a longo prazo e à estabilidade da interface entre o biomaterial e o tecido vivo (BRUNETTE et al., 2002). O TiO_2 e seus polimorfos exibem atividade antimicrobiana e também são utilizados em várias aplicações biológicas devido à sua estabilidade química, sensibilidade, seletividade, biocompatibilidade e natureza não tóxica aos seres vivos (TRINO et al., 2018).

Dentre as diversas composições possíveis das ligas de titânio, estudos com ligas Ti-Mo-Nb com a composição próxima à liga Ti10Mo8Nb exibiram baixo módulo de elasticidade (menor que 30 GPa) e alta dureza (entre 394 e 444 GPa), quando comparadas ao titânio comercialmente puro (Ti cp), conforme Xu et al. (2008). Ainda, segundo Chelariu e autores (2014), relatando a boa resistência à corrosão devido à adição do elemento Nb à liga Ti-Mo. Esta liga não exibiu efeitos citotóxicos em células osteoblásticas e não apresentou inflamações indesejadas (NEACSU et al., 2015).

As nanoestruturas de TiO_2 (1 – 100 nm) geram crescimento de célula devido à sua molhabilidade e rugosidade para ancoragem de células e diminuição de adesão de bactérias devido à grande área de superfície (CAROBOLANTE et al., 2018). Recentemente, a modificação da liga Ti10Mo8Nb por oxidação anódica foi realizada pelo Carobolante (2017) obtendo fase β após seu processamento. Após diversos estudos, os parâmetros de anodização mais adequados para aplicação biomédica foram: eletrólito composto por glicerol e água (1:1) com adição de 0,27% m/v de NH_4F , tensão de 20 V e tempo de 3 horas, com a formação de uma camada nanoporosa de TiO_2 . A fase anatase foi encontrada nas amostras calcinadas a 450°C por 3 horas. Essa camada nanoestruturada apresentou comportamento hidrofílico, o que viabilizou o crescimento de células adiposas sob a superfície. Análises *in vitro* resultaram em viabilidade de crescimento de célula e diminuição na proliferação de bactérias devido à grande área específica de superfície (CAROBOLANTE et al., 2018). As propriedades da camada nanoestruturada de dióxido de titânio estão diretamente relacionadas às características de superfície do material, no qual pode ser ajustada pelos métodos de síntese.

A técnica empregada para modificar a superfície pode influenciar a morfologia, fase cristalina, espessura, rugosidade, molhabilidade, química da superfície e, conseqüentemente, sua aplicação. Essas características podem também ser modificadas por grupos funcionais. Grupos bifuncionais reativos podem ligar-se aos grupos hidroxila do TiO_2 , formando filmes monocamadas ou multicamadas (TRINO et al., 2018).

Ainda, visando modificar a superfície das ligas de maneira a melhorar suas propriedades em relação às ligas já existentes, diversos estudos sobre deposição e incorporação de nanopartículas na superfície do material são encontrados na literatura (LI et al., 2018) encontrando na ciência e engenharia em nanoescala um aliado, já que permite o conhecimento e controle do material em seu estado mais fundamental: nível atômico e escala molecular (MAHMOUDI et al., 2011). Nanopartículas individuais possuem alta área de superfície para ataque microbiano e são um fator importante que determina as propriedades toxicológicas da nanopartícula (RAJENDRAN et al., 2017). Geralmente, nanopartículas de óxido de ferro não liberam substâncias tóxicas ao organismo e são biodegradáveis, tornando-as candidatas atrativas para estudos de nanoagentes com aplicação biomédica (LUNIN et al., 2019).

Nos anos recentes muita pesquisa tem sido dedicada à fabricação de materiais nanoestruturados de Fe_2O_3 de maneira a melhorar sua performance nas mais diversas aplicações (MOHAPATRA; BANERJEE; MISRA, 2008). Em particular, o TiO_2 e o Fe_2O_3 são dois importantes semicondutores e seus estudos têm aumentado na última década (ZHU et al., 2012).

Estes materiais têm sido estudados visando aplicação biomédica, pois cientistas, cirurgiões ortopédicos e bioengenheiros têm investigado maneiras de eliminar ou ao menos reduzir a incidência de falhas de implantes ósseos em humanos. Especialistas afirmam que a causa para as falhas seja o baixo desempenho dos implantes em osseointegração incompleta entre o osso e a prótese (WEBSTER; EJIORFOR, 2004).

Os resultados obtidos mostrando a viabilidade do emprego da liga $\text{Ti}_{10}\text{Mo}_8\text{Nb}$ em aplicações biomédicas levou à continuidade desse estudo com a deposição de óxido de ferro na superfície da liga visando o aumento da osseointegração desse material. Os óxidos Fe_2O_3 e Fe_3O_4 são os principais alvos de estudo nas áreas médicas e farmacêuticas devido às suas propriedades físico-químicas, sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (ABDOLLAH; FERESHTEH; NAZANIN, 2017; LEWIS et al., 2016; RAJENDRAN et al., 2017).

As propriedades funcionais dos filmes finos podem ser melhoradas por meio de modificações de superfície, como a oxidação anódica, para se adequar a diversas aplicações. A superfície com o óxido facilita a forte adesão dos grupos funcionais reativos, produzindo superfícies com grande estabilidade e funcionalidade. Ainda, moléculas que terminam em amino ou ácido carboxílico por exemplo são relevantes na interação com proteínas do meio biológico, que ocorre imediatamente após a inserção do implante. As proteínas adsorvidas conduzem a subsequente interação do material com as células. Porém, não existem estudos sobre funcionalização em superfície de liga de titânio com incorporação de óxido de ferro (STOIMENOV et al., 2002).

Com isso, o objetivo deste estudo é incorporar óxido de ferro na superfície da liga Ti10Mo8Nb anodizada nos parâmetros encontrados por Carobolante (2017) para crescimento de célula sob a superfície, visando o aumento da osseointegração. Não há estudos prévios sobre incorporação de óxido de ferro visando aplicações biomédicas na literatura. Ainda, a superfície foi funcionalizada para aumentar a resistência à corrosão e melhorar bioatividade. Assim, as técnicas existentes na literatura (oxidação anódica, método dos precursores poliméricos e funcionalização da superfície) foram combinadas de maneira a obter melhores propriedades para aplicações biomédicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1.1 Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como qualquer material usado na fabricação de dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável (PARK, J. e LAKES, R. S., 2007). O prefixo “bio” da palavra biomateriais refere-se à “biocompatível”. Biomateriais são substâncias biocompatíveis utilizadas no mundo biológico para análise, tratamento e suporte aos seres vivos, podendo substituir ou auxiliar parte de um órgão ou tecido vivo, enquanto diretamente em contato com ele (CHEN; THOUAS, 2015).

Os biomateriais são classificados em classes, de acordo com a compatibilidade que apresentam com seus tecidos adjacentes (BATH, 2002):

- Biotolerante: uma camada de tecido mole ao longo da interface separa o implante do osso adjacente. Assim, não há contato durante o processo de formação óssea (osteogênese) e a camada é induzida pela liberação por parte do implante de monômeros, íons e produtos de corrosão. Alguns exemplos são polímeros sintéticos e a grande maioria dos metais.

- Bioinerte: não há reação química entre o tecido e o implante, apesar de haver contato direto entre o tecido ósseo e o implante, ocorrendo participação na osteogênese. Exemplos de biomateriais bioinertes são alumina, zircônia, titânio, tântalo, nióbio e carbono.

Após a inserção ou implantação de um equipamento biomédico, a superfície inerte é rapidamente revestida com proteínas teciduais, incluindo fibrogênio, colágeno e outros substratos solúveis, todos funcionam como adesão para ataque microbiano. Conforme o biofilme microbiano evolui em complexidade, pode requerer remoção completa da prótese e de seus componentes associados. (EDMISTON et al., 2006).

- Bioativo: ocorre interação entre o tecido ósseo e o implante, interferindo diretamente na osteogênese e, por similaridade química, a parte mineral do tecido ósseo liga-se ao implante promovendo formação óssea ao longo do implante (osteocondução). Os principais exemplos desta classe são vitrocerâmicas, hidroxiapatita e cálcio-fosfato.

O mecanismo de bioatividade está relacionado à troca de íons com os fluidos corpóreos, ao efeito de carga na superfície e à topografia em micro ou nanoescala (YANG et al., 2008).

- Bioabsorvíveis: são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo após certo período de tempo em contato com os tecidos. Estes materiais são adequados em aplicações clínicas no qual a retirada do implante não seja aconselhável. Alguns representantes desta classe são fosfato tricálcico e poli-L-ácido láctico.

De acordo com Hench e Wilson (1993), o histórico de estudos envolvendo biomateriais pode ser dividido em 3 gerações:

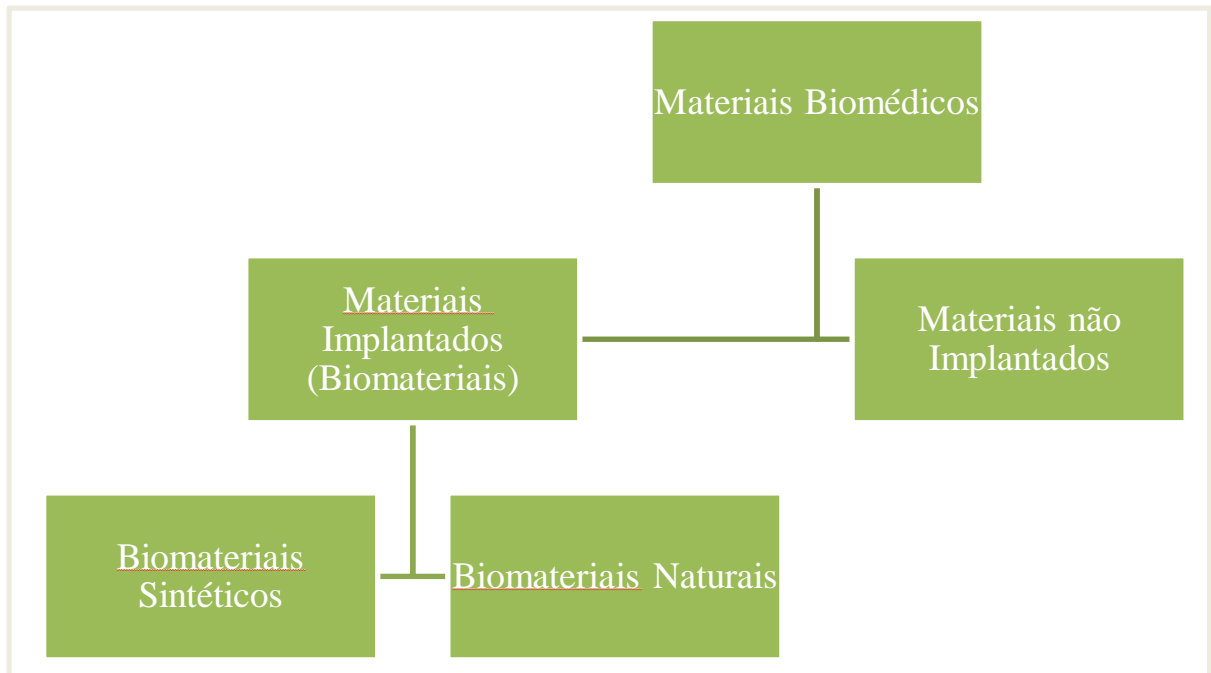
a) Primeira geração: conhecida como geração dos materiais bioinertes, ocorreu entre 1950 e 1970. O principal objetivo era que o corpo não rejeitasse o material implantado e que esse apresentasse propriedades mecânicas minimamente suficientes. Tanto materiais naturais como sintéticos eram usados no tratamento dos pacientes.

b) Segunda geração: entre 1970 e 2000. O principal objetivo é pesquisar materiais que provoquem respostas benéficas do organismo e materiais biodegradáveis. Nesse período teve maior interesse em materiais com um melhor desempenho e qualidade durante um maior período.

c) Terceira geração: geração atual. Utiliza-se micro e nanotecnologia, combinando os materiais, com o objetivo de compreender e melhorar os mecanismos da regeneração dos tecidos.

Quanto à origem, os biomateriais podem ser naturais ou sintéticos, conforme Figura 1 (CHEN; THOUAS, 2015; KUMAR et al., 2018). Os materiais derivados de organismos vivos são denominados biomateriais naturais, como por exemplo, ossos, pele, tendões, córnea, nervos, músculos e sangue. Por serem originários de seres vivos, apresentam vantagens: baixa toxicidade em relação aos biomateriais sintéticos, propriedades mecânicas próximas às propriedades do órgão ou tecido reparado ou ainda serem naturalmente degradados. Em comparação aos biomateriais sintéticos, os biomateriais naturais têm manipulação mais difícil devido à sua complexidade biológica. Ambos tipos de biomaterial, naturais e sintéticos, podem ser reconhecidos pelo hospedeiro como um corpo estranho, desencadeando assim uma reação imunológica. O grupo de biomateriais de origem sintética são classificados em 4 categorias: metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos. Eles são manipulados para apresentarem propriedades específicas (ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013).

Figura 1 - Classificação dos tipos de materiais biomédicos.



Fonte: Adaptado de Chen e Thouas (2015).

O termo “material biomédico” é utilizado para representar um componente de qualquer instrumento biomédico aplicado com ou sem contato direto ao tecido humano. A definição de biomateriais na comunidade científica é utilizada para descrever materiais aplicados apenas com contato direto ao tecido vivo (CHEN; THOUAS, 2015). Por exemplo, as próteses dentárias são biomateriais e as pernas mecânicas são instrumentos biomédicos. Assim, biomateriais são materiais biomédicos implantados. Os materiais biomédicos podem ser formados pela união de dois ou mais materiais, originando um novo biomaterial com propriedades intermediárias dos materiais que os formam. Os compósitos podem ser utilizados, por exemplo, na cimentação de ossos, em implantes dentários ou ortopédicos (ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013).

Metais e suas ligas estão sendo utilizados em aplicações ortopédicas e dentárias devido às propriedades físicas, mecânicas e químicas desejáveis, tais como alta resistência mecânica, resistência à corrosão e baixo módulo de elasticidade (GEETHA et al., 2009; INDIRA; KAMACHI MUDALI; RAJENDRAN, 2017). Dentre os metais, o titânio é um dos materiais mais promissores a serem utilizados como biomateriais (KULKARNI et al., 2016). Isso ocorre porque ele e as suas ligas possuem propriedades únicas, como resistência à corrosão, devido à formação da camada de óxido na superfície (TAN et al., 2012), boas propriedades mecânicas, baixa densidade e excelente biocompatibilidade (KULKARNI et al., 2016; OLMEDO et al., 2008), tanto com o osso quanto com o sangue humano (INDIRA; KAMACHI MUDALI; RAJENDRAN, 2017). Estas características permitem que o titânio seja altamente aplicável na

área de implantes, por exemplo implantes ortopédicos e dentários osseointegrados (CHEN; THOUAS, 2015; FADL-ALLAH; QUAHTANY; EL-SHENAWY, 2013).

2.1.2 Biocompatibilidade

Um biomaterial não deve causar inflamações indesejadas ao corpo humano, visto que é implantado diretamente em contato com os tecidos vivos. Entretanto, os requisitos de biocompatibilidade variam conforme a aplicação, por exemplo, um material satisfatório para aplicações cardiovasculares deve ter características diferentes de um material para cirurgia ortopédica (CHEN; THOUAS, 2015).

Há dois fatores principais que afetam a biocompatibilidade de um material: resposta do hospedeiro induzida pelo material e degradação do material no organismo (GEETHA et al., 2009). De maneira geral, de acordo com Chen e Thouas (2015), um implante que é utilizado apropriadamente por um longo período sem rejeição deve apresentar no mínimo as seguintes características:

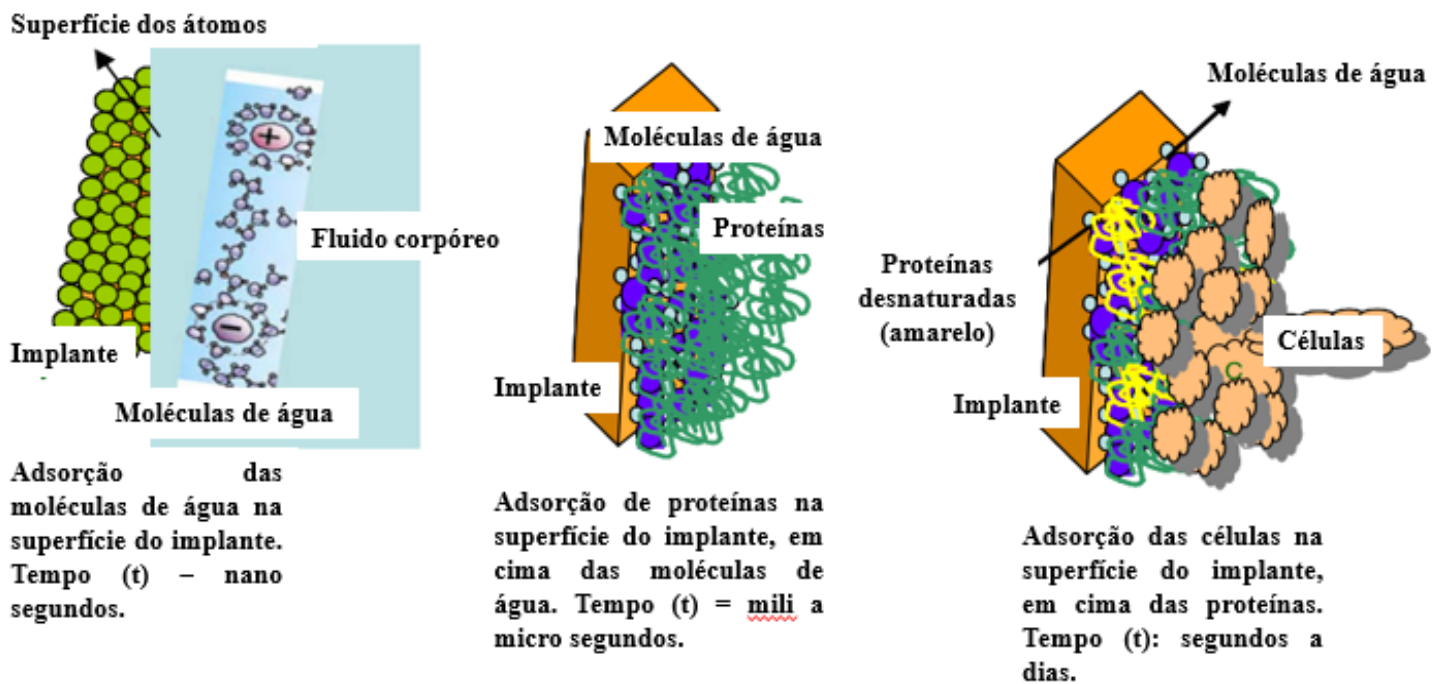
- a) Excelente biocompatibilidade (não toxicidade);
- b) Alta resistência à corrosão;
- c) Propriedades mecânicas adequadas à aplicação;
- d) Alta resistência ao desgaste;
- e) Osseointegração (no caso de próteses ósseas).

2.1.3 Osseointegração

Osseointegração é o contato direto do osso com o implante, no qual ocorre o processo de cicatrização sem que haja inflamação crônica (SPRIANO et al., 2018). Ela descreve o processo de formação de novos ossos e a cicatrização óssea (CHEN; THOUAS, 2015). É a união estável e funcional, química ou física, entre o osso e a superfície do titânio, sem formar uma camada de tecido na interface entre eles (FEARS; TARONE, 1977). Para alcançar a osseointegração efetiva, o carregamento da biomolécula na superfície do implante deve ser adequada, utilizando alguns métodos de tratamento de superfície (CHEN; THOUAS, 2015), tais como deposição eletroquímica, anodização (FADL-ALLAH; QUAHTANY; EL-SHENAWY, 2013; KIRMANIDOU et al., 2016; MOHAN et al., 2012; ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011), revestimento de hidrogel, revestimento camada a camada e imobilização (KUMAR et al., 2018).

Assim que o implante é inserido no organismo, a superfície do implante interage com água, fluídos biológicos e íons dissolvidos e o processo de cicatrização começa a ocorrer, conforme esquematizado na Figura 2. De acordo com o tipo de células e suas atividades, dois tipos de respostas do corpo hospedeiro podem ocorrer: integração direta do osso ao implante sem camada de tecido conectando os dois (osseointegração) ou formação de camada de tecido fibrosa seguida de falha clínica do implante (SPRIANO et al., 2018). Entretanto, as falhas de implantes devido à osseointegração podem ocorrer por outros fatores como baixa qualidade óssea, técnica cirúrgica traumática, tabagismo, osteoporose, ingestão de drogas ilícitas, entre outros (DE OLIVEIRA et al., 2012).

Figura 2 - Resposta do corpo humano ao implante em diferentes intervalos de tempo e reações ocorrendo durante a adesão celular no implante.



Fonte: Adaptado de Geetha et al. (2009).

Conforme os estudos de Geetha et al. (2009), inicialmente, há adsorção das moléculas de água e proteínas (Figura 2). Posteriormente, o processo de quando ocorre formação de tecido fibroso, indicando possível falha no implante, segue a sequência:

- Formação de novas células ósseas na superfície do implante, proliferação das células ósseas e diferenciação;
- Resposta inflamatória como resposta do corpo humano rejeitando o implante;

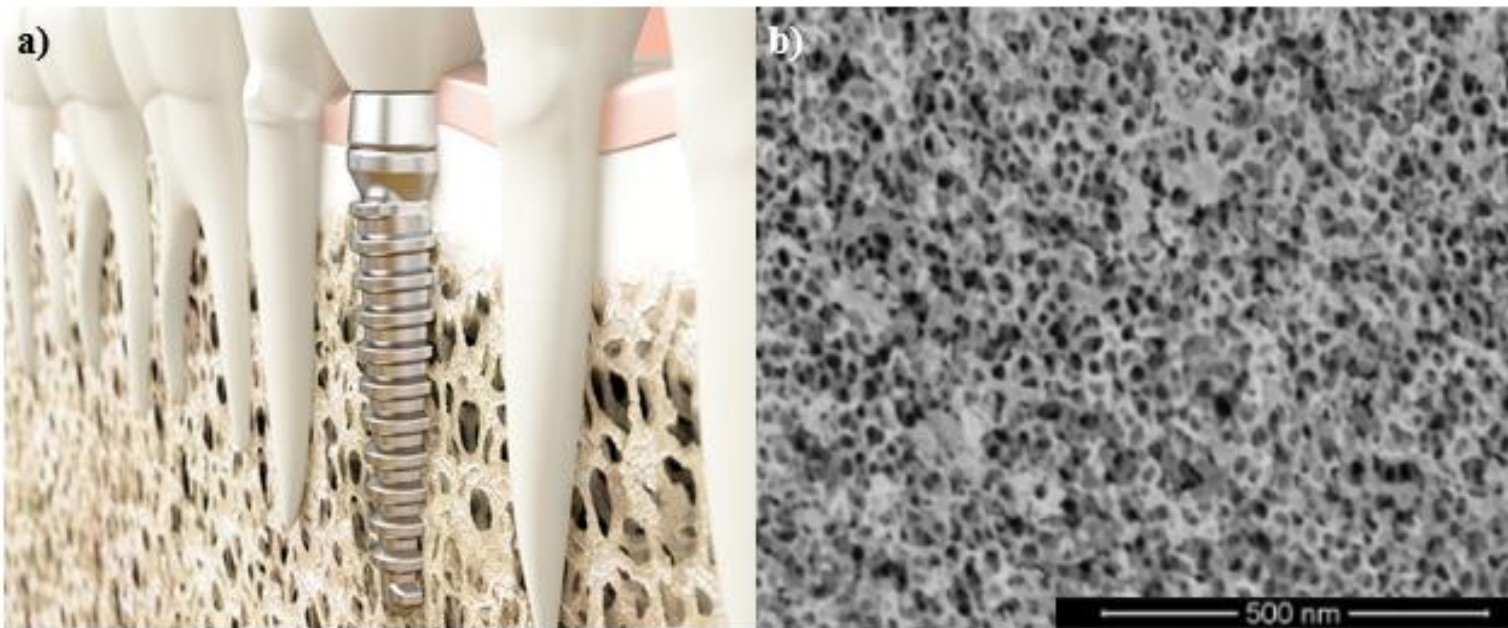
c) Formação de um tecido fibroso na interface do implante ao invés da interface do osso, que impede a osseointegração.

De acordo com Spriano et al. (2018), o período de inflamação considerado como resposta normal do organismo ocorre em menos de uma semana, caso esta condição permaneça por mais de três semanas, é geralmente relacionada à infecção ou falha do material. E a total osseointegração ocorre em um período de três a cinco meses, segundo Kirmanidou et al. (2016).

Quanto maior o grau de osseointegração, maior a estabilidade mecânica e menor a probabilidade de falha no implante. Isso pode ser obtido modificando a superfície do implante e existem diversas estratégias para melhorar a integração óssea das ligas de Ti. Além disso, a porosidade do implante também tem papel importante na osseointegração, tema que tem sido estudado desde 1972 por Weber e White (WEBER; WHITE, 1972).

O crescimento do osso na superfície porosa (Figura 3) pode causar forte ligação ao redor do tecido ósseo com o implante, resultando em melhor compatibilidade biomecânica e alta resistência (GEETHA et al., 2009). Em 1999, Zwilling e co-autores descobriram que as membranas porosas poderiam ser produzidas em Ti por meio de oxidação anódica em eletrólito de fluoreto (WANG et al., 2017).

Figura 3 – a) Esquema de prótese dentária com estrutura porosa do osso; b) Nanoporos obtidos após anodização na superfície da liga Ti10Mo8Nb.



Fonte: Adaptado de Carobolante (2017).

Desordens no osso e fratura óssea têm aumentando, devido ao aumento de expectativa de vida da população mundial, sendo 80 anos para mulheres e 73 anos para homens (KRAMER et

al., 2013). Com o envelhecimento, a habilidade natural do corpo humano em restaurar função após um trauma ou desgaste diminui (SUBBIAHDOSS et al., 2012). A vida útil média de um implante ortopédico é de 10 a 15 anos, assim, em muitos casos os pacientes precisam passar por dolorosas cirurgias e longa reabilitação (BJURSTEN et al., 2010). Como resultado, aumentou a demanda para técnicas melhoradas e materiais para o reparo e regeneração do osso humano. O osso é o sistema de suporte estrutural do corpo e seu material é composto por uma estrutura hierárquica complexa (KRAMER et al., 2013).

O ferro é um material de interesse nas aplicações relacionadas ao osso devido ao fato de estar presente naturalmente em quantidades vestigiais nos dentes e ossos (KRAMER et al., 2013).

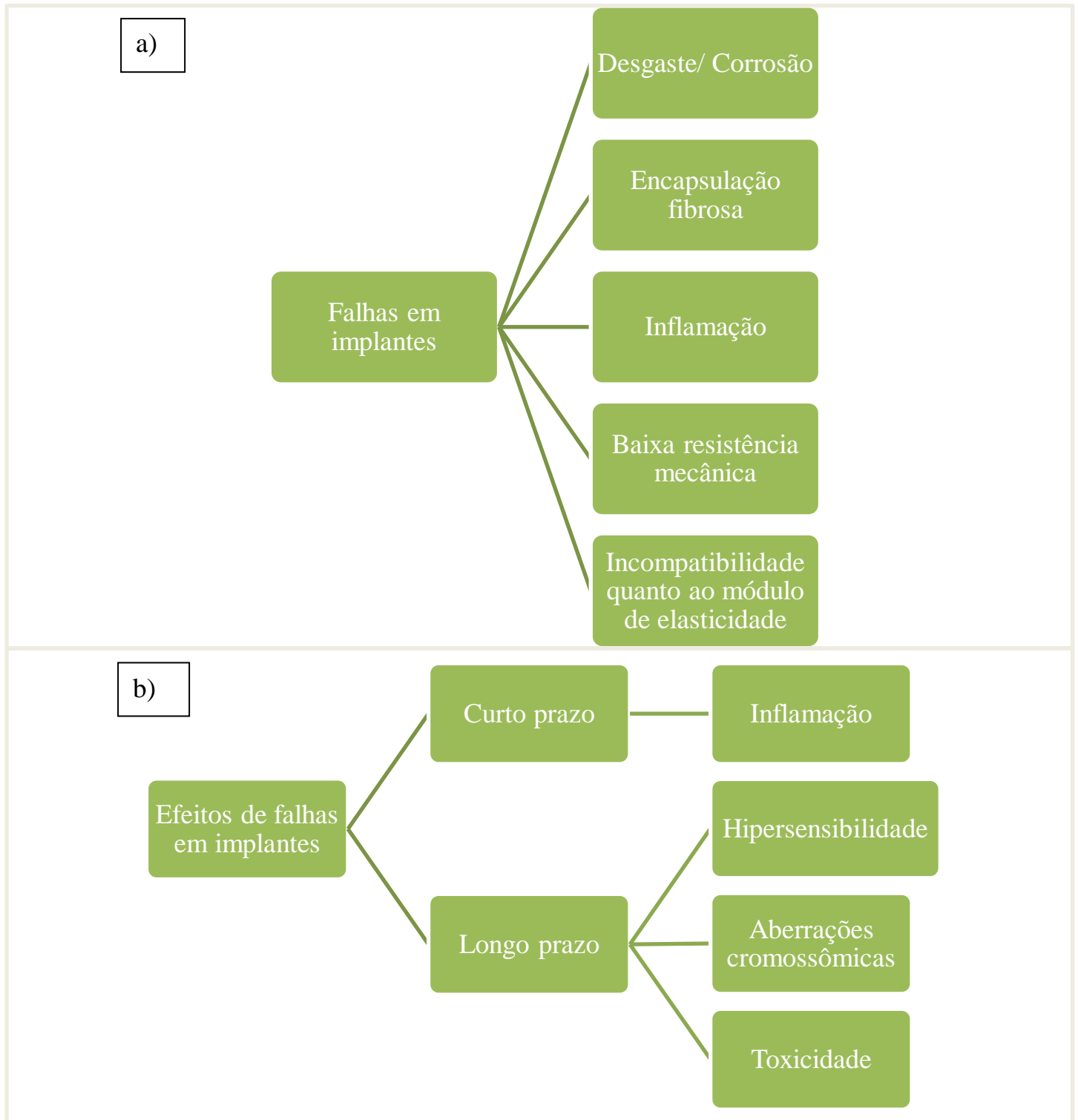
2.1.4 Implantes

Os implantes biomateriais são indispensáveis na medicina moderna para a restauração de função de uma determinada parte do corpo humano e permitem que os pacientes mantenham sua qualidade de vida ao longo de seu envelhecimento (SUBBIAHDOSS et al., 2012). Os implantes facilitam o uso normal da parte lesionada do corpo (OLMEDO et al., 2008).

O maior desafio em implantes é melhorar a conexão estrutural entre o osso e o implante. O osso consiste de células, proteínas e minerais. A superfície do implante tratada com biomolécula aumenta a osseointegração, de acordo com Subbiahdoss et al. (2012).

Infecção em implantes ou equipamentos biomateriais constituem a maior causa de falha e podem ocorrer muitos anos após a implantação (SUBBIAHDOSS et al., 2012). Existem diversas causas que geram as falhas em implantes e, conseqüentemente, as cirurgias de revisão, conforme pode ser observado na Figura 4a. Na Figura 4b observa-se os efeitos das falhas em implantes a curto e longo prazo.

Figura 4 – a) Principais causas de falhas em implantes; b) Efeitos de falhas em implantes a curto e longo prazo.

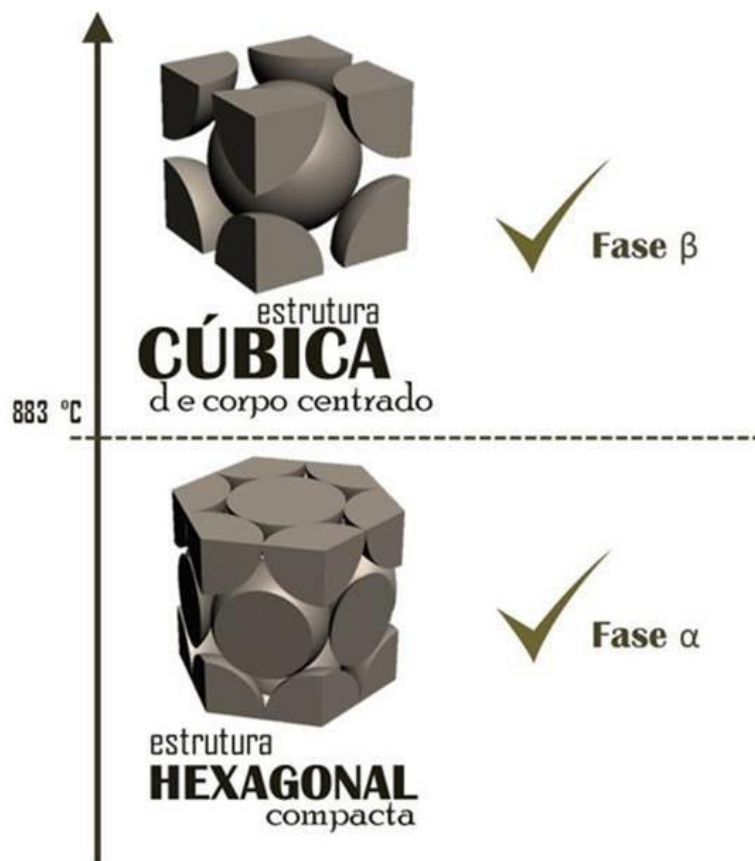


Fonte: Adaptado de Geetha et al. (2009).

2.2 TITÂNIO E SUAS LIGAS

A partir da metalurgia do titânio, observa-se que é o único metal leve com a característica de dimorfismo, no qual apresenta uma transformação alotrópica a aproximadamente 883°C. Nessa temperatura, o titânio passa de estrutura cristalina hexagonal compacta (fase α) para uma estrutura cristalina cúbica de corpo centrado (fase β) (CHEN; THOUAS, 2015), como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - O titânio é um elemento alotrópico, apresentando estrutura hexagonal compacta (HC) e, acima de 883°C, estrutura cúbica de corpo centrado (CCC).



Fonte: Adaptado de Carobolante (2017).

As ligas de titânio podem ser classificadas em α , quase- α (coexistência de α e β , predominância da α), α - β , quase- β (coexistência de α e β , predominância da β) ou β . Cada uma destas fases possui microestrutura após o processamento da liga, tratamentos térmicos e mecânicos característicos (KIRMANIDOU et al., 2016). De acordo com Yilmaz et al. (2018), as ligas de titânio com fase β são as melhores para implantes e biomateriais.

As ligas de titânio β são geralmente descritas como da segunda geração de biomateriais de titânio. As principais características que comprovam o fato de que é a melhor como biomaterial em relação às demais são: valor do módulo de Young próximo ao do osso, biocompatibilidade e boa resistência à corrosão (CHEN; THOUAS, 2015).

Para estabilizar cada uma das fases, utiliza-se os elementos de liga, que são de grande importância para controlar as propriedades da liga e a microestrutura. Os elementos α estabilizadores mais utilizados são alumínio, oxigênio, carbono e nitrogênio, tais elementos incrementam a temperatura na qual essa fase é estável. No caso da fase β , os principais elementos utilizados são vanádio, molibdênio, níquel, nióbio e tântalo, eles permitem que a fase seja estável em temperaturas menores que a transição β (KHUDHAIR et al., 2016; NEACSU et al., 2015).

Titânio e suas ligas não induzem formação do osso em sua superfície (MOHAN et al., 2012), eles não podem ser ligados diretamente ao osso humano após sua implantação (TAN et al., 2012). O titânio é muito reativo em relação ao oxigênio e forma um filme de óxido quimicamente estável. A camada de óxido nativa do titânio não pode ser diretamente ligada ao osso porque possui natureza amorfa, propriedades mecânicas ruins e baixa biocompatibilidade (KUMAR et al., 2018). Além disso, a camada de óxido formada é bioinerte e forma novos ossos de maneira ineficiente, o que leva à falha e perda do implante. Assim, o paciente precisa sofrer uma cirurgia de revisão dolorosa. Portanto, para evitar essas complicações, a superfície do titânio necessita ser modificada (INDIRA; KAMACHI MUDALI; RAJENDRAN, 2017).

A interação entre o implante e o tecido depende da química da superfície do biomaterial. Essa camada de óxido cresce espontaneamente em contato com o ar e previne a difusão do oxigênio no meio, fornecendo resistência à corrosão (KUMAR et al., 2018; MINAGAR et al., 2012). As propriedades de superfície de um biomaterial são muito importantes para determinar a resposta celular do material, tanto a adesão celular quanto a proliferação. De maneira que melhore a osseointegração da interface osso-implante, as propriedades da superfície podem ser modificadas utilizando técnicas adequadas de modificação da superfície (KUMAR et al., 2018; LI et al., 2018).

Na Figura 6, se apresentam algumas das diversas aplicações do Ti e suas ligas na biomedicina.

Figura 6 - Aplicações biomédicas do titânio e suas ligas: a) implante dentário rosqueado, b) ligamento artificial de joelho, c) implante coxo-femoral, d) enxerto ósseo (tela de titânio substituindo região do crânio) e e) exemplos de pinos e parafusos de ligas de titânio utilizados em implantes em geral.



Fonte: Adaptado de Khundhair et al. (2016).

Diversos fatores, tais como composição da superfície, rugosidade e molhabilidade são importantes para a interação entre o implante e a osseointegração (INDIRA; KAMACHI MUDALI; RAJENDRAN, 2017). Quanto maior a rugosidade da superfície, maior será a estabilidade mecânica dos implantes, que leva à boa interligação entre a superfície do implante e o crescimento do osso (INDIRA; KAMACHI MUDALI; RAJENDRAN, 2017). A rugosidade da superfície influencia na resposta celular, que melhora a adesão e proliferação de células (BJURSTEN et al., 2010; INDIRA; KAMACHI MUDALI; RAJENDRAN, 2017). Quanto menor a rugosidade, menor o contato com o osso (INDIRA et al., 2015; INDIRA; KAMACHI MUDALI; RAJENDRAN, 2017).

De acordo com Roy, Berger e Schmuki (2011), ao inserir elementos de liga no titânio, eles podem afetar drasticamente suas propriedades, porém a morfologia nanotubular após anodização permanece a mesma. E, após a oxidação anódica da liga, a composição do óxido é consistente com a relação dos metais da liga.

Estudos teóricos de Geetha et al. (2009), relatam que o Nb, Zr e Mo são os elementos mais adequados que podem ser adicionados ao Ti com o objetivo de diminuir o módulo de

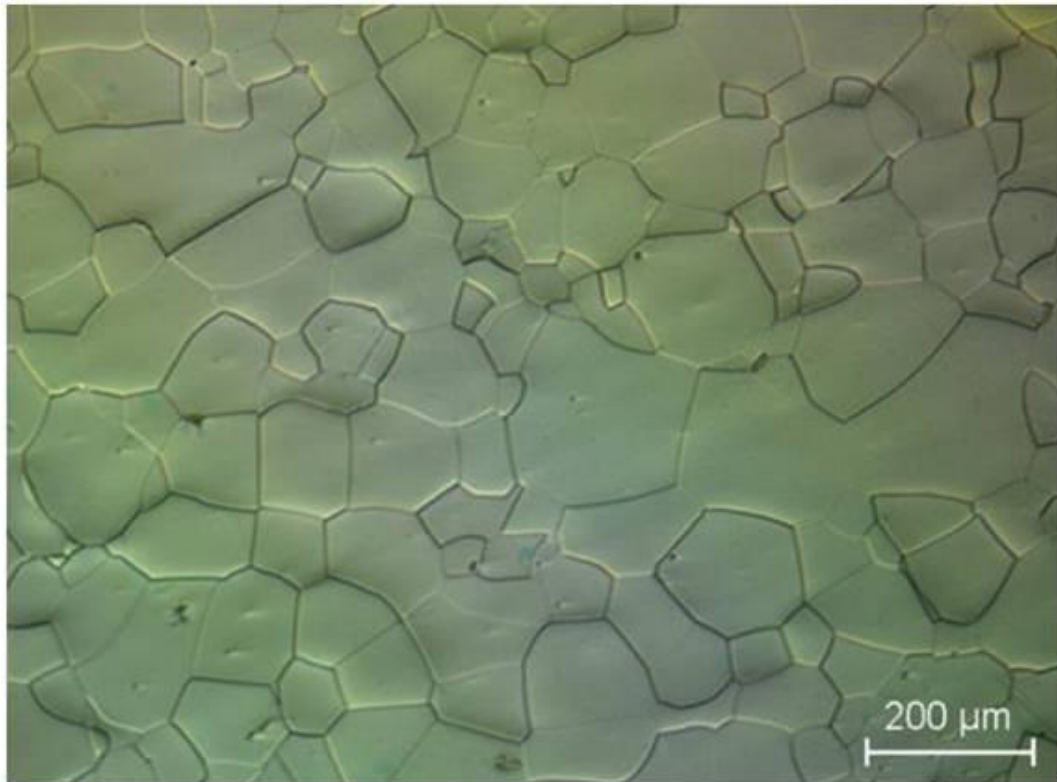
elasticidade sem comprometer a resistência mecânica. Tais elementos são da categoria de baixa toxicidade em relação aos demais elementos da tabela periódica, que os tornam melhores para as aplicações biomédicas.

O elemento nióbio apresenta excelente biocompatibilidade e resistência à corrosão (JIN et al., 2016; NEACSU et al., 2015). Enquanto o elemento molibdênio tem propriedades mecânicas compatíveis à aplicação biomédica, boa citotoxicidade e é um forte estabilizador da fase β em comparação aos outros elementos (NEACSU et al., 2015; VERISSIMO et al., 2014). Concentrações de Mo maiores que 10% em peso estabilizam a fase β . Em contrapartida, o nióbio foi estudado como elemento de liga para substituição das ligas do sistema Ti-Ni e foi constatado que em concentrações de até 15% em massa de Nb, as ligas apresentavam fase α' , entre 15 e 35% estabilizava-se a fase α'' e acima dessa concentração a fase β se torna dominante. Além de excelente biocompatibilidade e resistência à corrosão, o óxido formado nas ligas Ti-Nb agiu como um ótimo suporte para adesão e proliferação celular sem nenhuma resposta indesejada (CHELARIU et al., 2014; YILMAZ et al., 2018).

Existem poucos estudos na literatura sobre atividade biológica das ligas β -Ti contendo Mo e/ou Nb em várias proporções ou em adição a outros elementos não tóxicos. Novas ligas de titânio estão sendo estudadas para a próxima geração de implantes metálicos para garantir boa compatibilidade com o osso e entre elas está sendo estudada a liga do sistema ternário Ti-Mo-Nb (NEACSU et al., 2015). Estudos comprovam que a superfície anodizada da liga Ti-Nb aumentou a proliferação de células osteoblásticas e a estrutura nanoporosa aumentou a adesão celular sem resposta inflamatória indesejada (JIRKA et al., 2013; MARTINS JÚNIOR et al., 2011; WANG; ZHENG, 2009; XU et al., 2013). Ainda, estudos da liga Ti-Mo concluíram que a liga apresenta boa biocompatibilidade em relação à citotoxicidade e resposta favorável *in vivo* a curto prazo.

As ligas do sistema ternário Ti-Mo-Nb foram estudadas por Xu et al. (2008) quanto às suas propriedades mecânicas e microestrutura das ligas Ti₁₀Mo₃Nb, Ti₁₀Mo₇Nb e Ti₁₀Mo₈Nb (TMN). Todas as ligas apresentaram grãos equiaxiais da fase β em uma matriz α , ocorrendo um aumento da fase β com o aumento do teor de nióbio. Pode-se observar a microestrutura obtida a partir da técnica de microscopia óptica da liga TMN na Figura 7. Estudos *in vitro* de Neacsu et al. (2015) constataram que a liga ternária Ti-Mo-Nb apresenta boa biocompatibilidade e não impactam negativamente na adesão, morfologia, taxa de proliferação e potencial de diferenciação das células osteoblásticas quando comparada ao material de referência (Ti comercialmente puro). Desta forma, esta liga é inovadora para regeneração óssea.

Figura 7 - Micrografia óptica da liga Ti10Mo8Nb, apresentando fase β .



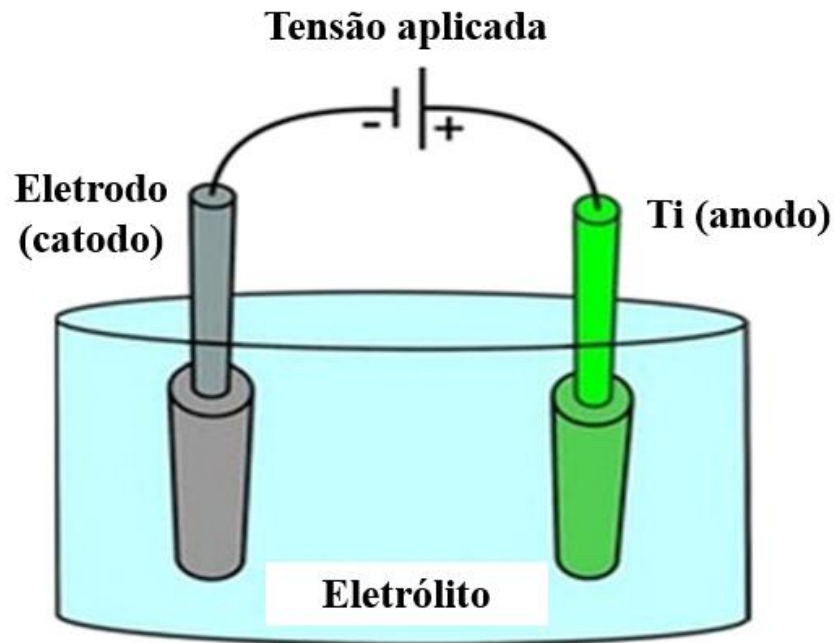
Fonte: Chelariu et al. (2014).

2.3 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE – OXIDAÇÃO ANÓDICA

A oxidação anódica, também chamada de anodização, é uma técnica simples de modificação da superfície (KHUDHAIR et al., 2016; WEBSTER; EJIORFOR, 2004). Embora o primeiro relato sobre anodização no Ti tenha sido em 1984 (ASSEFPOUR-DEZFULY; VLACHOS; ANDREWS, 1984), tais estruturas foram depois evidenciadas em 1999 por Zwilling et al. (1999) (KHUDHAIR et al., 2016; V. ZWILLING A. BOUTRY-FORVEILLE, D. DAVID, M. Y. PERRIN, M. AUCOUTURIER, 1999). A anodização é geralmente utilizada porque tem baixo custo e fácil aplicação, além de auxiliar no crescimento uniforme da camada de TiO_2 na superfície da liga de titânio (INDIRA et al., 2015) e garantir o controle das nanoestruturas (KULKARNI et al., 2016). A anodização é um processo eletroquímico conduzido no metal para produzir uma camada de óxido do metal na superfície. O processo é realizado em uma célula eletroquímica que consiste em dois eletrodos, o eletrodo de trabalho (anodo) e o contra eletrodo (catodo), conforme esquematizado na Figura 8. O metal é empregado como anodo e o processo de oxidação inicia quando uma tensão externa é aplicada entre os eletrodos no eletrólito. A oxidação anódica é aplicada a tensão ou corrente constante.

Conforme a camada de óxido se forma, funciona como uma barreira para isolar a superfície do metal do eletrodo. De maneira a obter dissolução homogênea, não deve-se mudar a temperatura durante o processo (KHUDHAIR et al., 2016).

Figura 8 - Desenho esquemático da célula de anodização do Ti.



Fonte: Adaptado de Khundhair et al. (2016).

Os nanotubos de titânio anodizados (TNTs) possuem potencial para aplicações biomédicas, aumentam a adesão das células osteoblásticas e possuem funções desejáveis na proliferação, adesão e mineralização das células (KHUDHAIR et al., 2016; WEBSTER; EJIORFOR, 2004). Conforme Tan et al. (2012), os nanotubos de TiO_2 favorecem os osteoblastos quanto à adesão celular, proliferação e diferenciação. A alta área de superfície dos nanotubos anodizados aumenta o crescimento da hidroxiapatita e influenciam o comportamento celular para estimular a integração óssea. Os implantes de titânio com nanotubos de TiO_2 aumentam as forças de ligação do osso (BJURSTEN et al., 2010) e aumentam a bioatividade quando em contato com o tecido vivo (MINAGAR et al., 2012).

A morfologia das nanoestruturas, a geometria, o formato (PEIGHAMBARDUST; NASIRPOURI, 2013) e a rugosidade da superfície do material são propriedades de grande preocupação para a efetividade do material em um implante (LI et al., 2018). Os parâmetros de anodização, tais como tempo, temperatura, corrente aplicada, tensão e concentração eletrolítica

podem ser facilmente controlados para obtenção dos nanotubos com as propriedades desejadas (KULKARNI et al., 2016; MINAGAR et al., 2012).

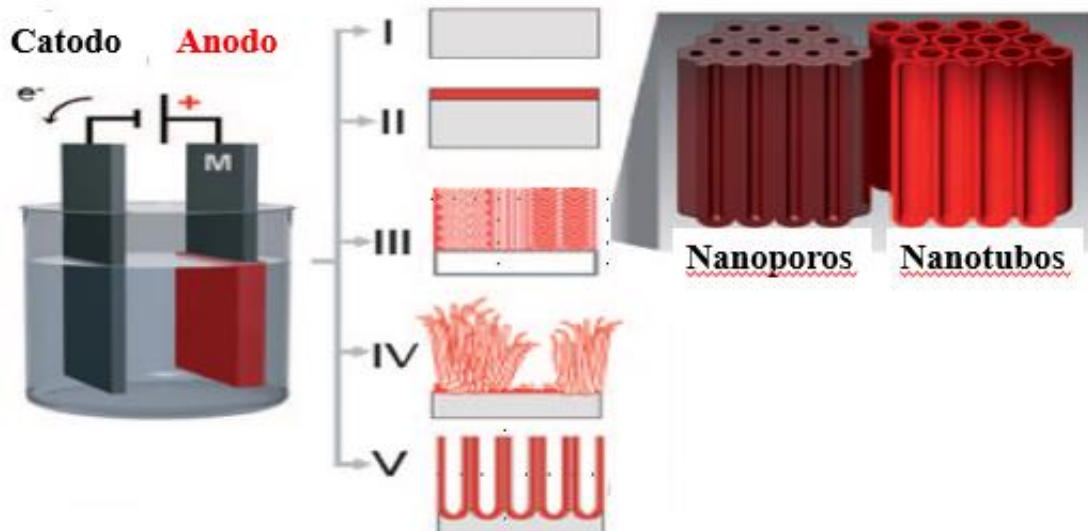
A presença dos íons fluoreto no eletrólito é necessária para a obtenção de estrutura porosa no titânio e suas ligas (HARING; MORRIS; HU, 2012). Na maioria das vezes, os eletrólitos utilizados são orgânicos e baseados em glicerol ou etilenoglicol (ELSANOUSI et al., 2008) e isso se deve ao fato de que eletrólitos orgânicos geram maior área de superfície e crescimento mais uniforme com ordenamento hexagonal. De acordo com Zwillling et al. (1999), dependendo do substrato metálico e das condições da anodização, os filmes óxidos formados podem exibir uma estrutura compacta ou porosa. A formação de óxidos porosos é considerada uma preparação da superfície importante para melhorar o comportamento dos metais, tais como das ligas de titânio. A estrutura porosa melhora o processo de osseointegração, de acordo com os estudos de Fadl-Allah et al. (2013), porque favorece a cicatrização do osso na superfície da liga.

Estudos anteriores relatam que o tratamento térmico aumenta a cristalinidade e reduz a concentração de flúor na superfície; além de aumentar a condutividade dos nanotubos, reduzindo os defeitos estruturais (INDIRA et al., 2012).

De acordo com Khudhair et al. (2016) e Crowford e Chawla (2009), conforme os parâmetros de anodização e os eletrólitos, é possível ocorrer as seguintes reações na célula de anodização (Figura 9):

- Dissolução do metal e formação de íons metálicos que são dissolvidos na solução;
- Interação dos íons metálicos formados por íons oxigênio fornecidos pelas moléculas de água do eletrólito para formar óxido metálico;
- Formação de camada densa de óxido metálico (II);
- Formação de uma camada porosa de óxido de metal como resultado de uma competição entre a formação do óxido e as reações de dissolução do óxido em condições específicas (estágio III);
- Nanoporos continuam crescendo dentro da camada, no qual há uma transição de nanoporos para nanotubos (estágio III para IV);
- Completa dissolução da camada porosa e da camada compacta, originando a formação de nanotubos de óxido metálico altamente ordenados (estágio V).

Figura 9 – Processo de anodização e possíveis morfologias anódicas: I) Superfície metálica; II) Formação de óxidos anódicos compactos; III) Nanotubos e nanoporos; IV) Formação desorganizada de nanotubos; V) Camadas ordenadas de nanotubos.



Fonte: Adaptado de Roy, Berger e Schmuki (2011).

Dentre os parâmetros de anodização, o eletrólito pode ser aquoso ou orgânico. Segundo Regonini et al. (2013), os eletrólitos aquosos são meios mais agressivos, resultando em camadas de filme fino mais espessas em relação aos eletrólitos orgânicos que ocorrem mais lentamente. Isso influencia também na tensão utilizada, sendo que em meios aquosos a tensão varia de 5 a 30 V e em meios orgânicos varia de 5 a 60 V. Normalmente a anodização é realizada à temperatura ambiente, que é mais favorável ao crescimento dos nanotubos. Em seus estudos, observaram que para eletrólitos aquosos, soluções abaixo de 2°C inibiam o crescimento destas estruturas, e que em eletrólitos orgânicos o crescimento não é favorável acima de 40°C.

De acordo com Li et al. (2018) e Khundair et al. (2016), para o titânio, as principais reações que ocorrem durante a oxidação anódica são:

- na interface Ti/ TiO₂:



- na interface TiO₂/ eletrólito:



- em ambas as superfícies:



2.4 ÓXIDO DE FERRO

2.4.1 Hematita

A hematita (Fe_2O_3) pertence ao grupo mineral de óxidos de ferro (JOYA; BARÓN-JAIMEZ; BARBA-ORTEGA, 2013). Existem três polimorfos comuns dos óxidos de ferro: hematita, magnetita e maghemita (DAVAR; HADADZADEH; ALAEDINI, 2016), sendo a hematita o óxido de ferro mais estável à temperatura ambiente (DAVAR; HADADZADEH; ALAEDINI, 2016; REHMAN et al., 2017; SADOWSKA; ADAMCZYK; NATTICH-RAK, 2017) e o semicondutor menos prejudicial ao meio ambiente (RAJENDRAN et al., 2017; RUFUS; SREEJU; PHILIP, 2019).

A hematita possui estrutura hexagonal (JOYA; BARÓN-JAIMEZ; BARBA-ORTEGA, 2013), no qual dois terços dos sítios octaédricos são ocupados pelos íons de Fe^{3+} (DAVAR; HADADZADEH; ALAEDINI, 2016). Em outras palavras, o oxigênio ocupa os sítios hexagonais e o ferro está situado apenas nos octaédricos (CHIRITA; GROZESCU, 2008). Ela possui estabilidade química, baixo custo, é abundante na natureza, é não tóxica (REHMAN et al., 2017) e possui comportamento paramagnético (CESAR et al., 2006; DAVAR; HADADZADEH; ALAEDINI, 2016; JOYA; BARÓN-JAIMEZ; BARBA-ORTEGA, 2013).

É utilizada como pigmento vermelho (FELDMANN, 2001), separação de células e hipertemia magnética induzida para células cancerígenas (CHIRITA; GROZESCU, 2008), catalisadores (BELL, 2003), entrega de medicamentos (CHIRITA; GROZESCU, 2008; LU; TSAI, 2014), eletrodos, sensores de gás, materiais magnéticos, fotocatalisadores, engenharia de reparo de tecidos e tintas de proteção anticorrosivas (CESAR et al., 2006; DAVAR; HADADZADEH; ALAEDINI, 2016; MOHAPATRA; BANERJEE; MISRA, 2008; REHMAN et al., 2017; RUFUS; SREEJU; PHILIP, 2019; WU; WANG, 2011).

O ferro é um dos nutrientes essenciais de todos os micro-organismos e atua como um cofator para diversas enzimas, é parte de citocromos e é requerido em processos metabólicos, incluindo a respiração, síntese de DNA, transporte fotossintético, fixação do nitrogênio e síntese de nitrato (RAJENDRAN et al., 2017).

Segundo Lewis et al. (2016) e Mahmoudi et al. (2011), a hematita com tamanho inferior a 100 nm, com grande área de superfície e estabilidade química, possui grande potencial em aplicações biomédicas. Estudos sobre a citotoxicidade do óxido de ferro em células do cérebro, demonstram que a incubação com esses óxidos metálicos em nanoescala, a concentrações fisiológicas, de fato não induzem toxicidade celular nem reações inflamatórias na célula (LEWIS et al., 2016; SADOWSKA; ADAMCZYK; NATTICH-RAK, 2017).

Nos anos recentes, muita pesquisa tem sido dedicada à fabricação de materiais nanoestruturados de Fe_2O_3 de maneira a melhorar sua performance nas mais diversas aplicações. Tais nanoestruturas possuem diferentes morfologias, como nanopartículas, nanofios, nanotubos e em forma de filmes (MOHAPATRA; BANERJEE; MISRA, 2008; RUFUS; SREEJU; PHILIP, 2019). Nanopartículas de hematita, com suas propriedades específicas, podem ser utilizadas em diversas aplicações biomédicas, tais como: entrega de medicamentos, agente de contraste em exames de ressonância magnética, separação de células e reparo de tecido vivo (RUFUS; SREEJU; PHILIP, 2019).

De maneira a estabilizar as nanopartículas de óxido de ferro, são utilizados estabilizadores, tais como surfactante ou um polímero, pois aderem à superfície. Ainda, deve-se observar o tempo de preparação para prevenir que as nanopartículas fiquem aglomeradas (ABDOLLAH; FERESHTEH; NAZANIN, 2017).

2.4.2 Método dos precursores poliméricos (método Pechini)

O método dos precursores poliméricos é também conhecido como método Pechini pois foi originalmente desenvolvido por Maggio Pechini em 1967 (PECHINI, 1967). O processo Pechini tem sido utilizado para a preparação de nano ou sub-micro partículas em uma variedade de óxidos de metal utilizando sais inorgânicos como precursores, ácido cítrico (AC) ou ácido tartárico (AT) como agente quelante e etilenoglicol (EG) ou polietilenoglicol (PEG) como agente de ligação cruzada (CESAR et al., 2006; MÉNDEZ et al., 2010).

O princípio do processo de Pechini é baseado na habilidade de ácidos polibásicos fracos em quelar os íons metálicos. Os quelatos podem ser submetidos a poliesterificação com álcool de polihidroxila para formar uma resina de polímero sólido com uma distribuição homogênea

de cátions em nível molecular (ORTEGA et al., 2014). A alta ramificação dos polímeros pode reduzir a mobilidade do cátion durante o tratamento térmico, então o produto com uma boa dispersão pode ser preparado (CESAR et al., 2006).

O processo Pechini é baseado na quelação dos cátions pelo ácido orgânico, por exemplo o ácido cítrico (AC), e na poliesterificação entre o ácido e o etilenoglicol (EG), que leva à formação de uma resina policatiônica (ORTEGA et al., 2014; PAILHÉ et al., 2008). Assim, é um método de polimerização de orgânicos *in situ* que visa reduzir as individualidades dos diferentes íons metálicos (RIBEIRO et al., 2010). O objetivo da rede polimérica orgânica produzida pela esterificação é reduzir qualquer segregação dos cátions (MÉNDEZ et al., 2010; MIRZAEI et al., 2016).

De maneira a melhorar a performance dos pós, métodos químicos como Pechini (método dos precursores poliméricos) têm sido investigados, de acordo com Ribeiro et al. (2010). De fato, essas rotas de baixa temperatura permitem o controle na morfologia, tamanho de grão e formato, que podem impactar na coloração do pó (PAILHÉ et al., 2008; RIBEIRO et al., 2010). Além disso, outras vantagens do processo Pechini são controle estequiométrico e baixo custo (CESAR et al., 2006; ORTEGA et al., 2014). Tal método permite mistura dos constituintes em escala molecular, levando a uma boa homogeneidade química, um aumento na relação da reação e um decréscimo na temperatura de cristalização (MÉNDEZ et al., 2010). De acordo com Ortega et al. (2014), o processo Pechini ainda apresenta vantagens como possibilidade de trabalhar com soluções aquosas, é livre de contaminação e sem necessidade de controle atmosférico.

2.4.3 Incorporação de óxido de ferro

Monocamadas ou multicamadas (filmes) de partículas em substratos sólidos possuem uma ampla gama de aplicações em catálises, sensores de umidade e de gases, revestimentos bactericidas, entre outras (KO et al., 2011). Existem diversos processos e tecnologias para produzir monocamadas e multicamadas na superfície partindo de suspensões de partículas, dentre eles, os mais eficientes para preparação de filmes altamente ordenados e empacotados são: método *spin coating*, *dip coating* e deposição por spray (ADAMCZYK et al., 2013).

Os materiais podem ser revestidos por imersão ou *spin coating*. No primeiro, o material é imerso na solução e é retirado após certo período de tempo, em condições ambientes. A espessura do filme formado depende da solução e de sua viscosidade. A atmosfera controla a evaporação do solvente, seguida de desestabilização da solução, gelação do processo e

formação do filme. Por outro lado, na segunda técnica, o material gira em torno de um eixo que é perpendicular à área na qual será formado o filme (GEETHA et al., 2009).

A técnica de *spin coating* é um método simples que oferece vantagens como baixo custo, controle na espessura do filme, reprodutibilidade do processo e a habilidade de promover revestimentos altamente uniformes (JIANG; MCFARLAND, 2004).

De acordo com Adamczyk et al. (2013), a deposição de partículas é frequentemente considerada como um processo de três estágios:

- a) Transferência de partículas do *bulk* da suspensão a distâncias macroscópicas até a vizinhança da superfície limítrofe;
- b) Transferência de partículas por meio do filme (camada limítrofe) adjacente à superfície;
- c) Formação de um contato íntimo com a interface ou com partículas depositadas previamente, conduzindo à fixação e à formação de mono ou multicamadas.

2.5 FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA

A superfície da liga pode ser modificada por meio da criação de camadas atômicas de polímero, metal ou superfícies óxidas, adequadas para posterior funcionalização pela ligação de moléculas bioativas (GUPTA; GUPTA, 2005). Analisando os tipos de ligação na interface do óxido de metal e o grupo funcional podem ajudar no desenvolvimento de materiais funcionais melhorados (TRINO et al., 2018).

Funcionalização da superfície é um método de modificação de superfície que tem sido desenvolvido para aumentar a efetividade de superfícies bactericidas. Este método envolve a introdução de revestimento com cadeia longa, hidrofóbica, carregada positivamente, tal como alcanos, polietilenos e aminos (HASAN; CRAWFORD; IVANOVA, 2013). Estudos comprovaram que as superfícies tratadas com polímero aumentam a adesão do biomaterial, sendo que normalmente a tensão de adesão de nanotubos de Ti é igual a 1,4 MPa e foi obtido o valor de 4,4 MPa com o tratamento de superfície (J. FOJT, V. FILIP, 2015).

As propriedades funcionais dos filmes finos podem ser melhoradas por meio de modificações de superfície para se adequar a diversas aplicações. Nos últimos anos, têm crescido o interesse na formação de superfícies óxidas quimicamente modificadas por funcionalidades orgânicas (LUNIN et al., 2019). A superfície com o óxido facilita a forte adesão dos grupos funcionais reativos (-SH, -COOH, -NH₂), produzindo superfícies com grande estabilidade e funcionalidade (HUYNH; ZHENG, 2013).

As moléculas orgânicas têm a tendência de serem adsorvidas na superfície do dióxido de titânio por meio de ligação covalente ou fisisorção. A presença de grupos hidroxila (-OH) na superfície, em condições ambiente, leva à formação de interações covalentes entre o -OH e um grupo funcional específico das moléculas orgânicas por meio de reações de condensação. A interação covalente entre o substrato e as porções orgânicas dependem das condições de reação e do tipo de grupo funcional presente no composto orgânico.

De acordo com Gupta et al. (2005), a modificação na superfície por meio de grupos funcionais pode ser classificada em sintética e natural. Os polímeros baseados em polietilenoglicol (PEG), ácido 3-4(aminofenil)propiónico (APPA) e ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) são exemplos típicos de sistemas sintéticos. No caso dos sistemas naturais, incluem o uso de gelatinas, quitosana e dextrano.

Conforme estudos de Trino et al. (2018), a ligação das moléculas de ácido 3-4(aminofenil)propiónico (APPA) e ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) na superfície do dióxido de titânio pode ocorrer por meio das fronteiras dos grãos devido à maior energia de superfície nessas regiões. Geralmente, as moléculas orgânicas que irão interagir com o dióxido de titânio possuem dois grupos funcionais. O grupo funcional com maior afinidade para o substrato, o grupo principal, interage covalentemente com os grupos -OH da superfície. O outro grupo funcional terminal estará livre para interagir com outras moléculas na superfície, tais como peptídeos ou proteínas que são úteis em bioaplicações. Ainda, o grupo terminal será adicionalmente responsável pelas características da superfície orgânica, que irão definir as propriedades de superfície.

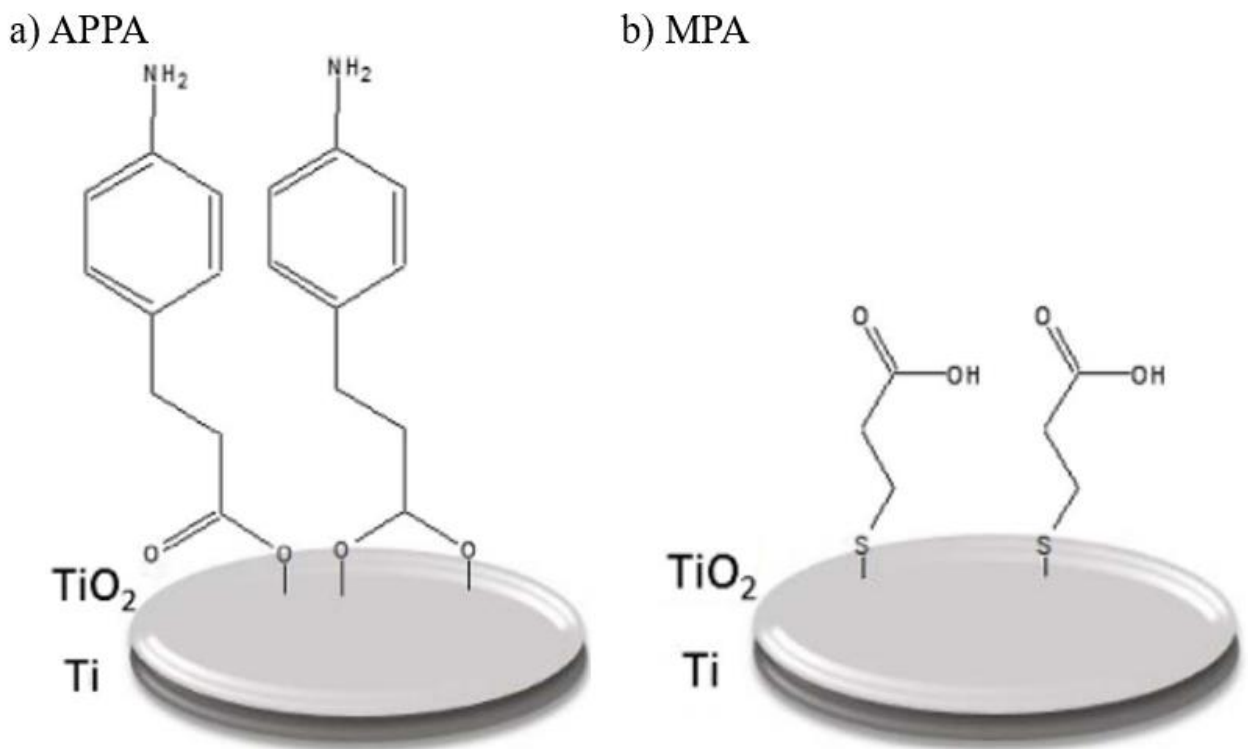
Existem duas maneiras normalmente utilizadas para funcionalização da superfície: a deposição de multicamadas ou a ligação entre monocamadas (GAO; TEPLYAKOV, 2017). As monocamadas resultam em camadas ordenadas, orientadas e empacotadas de moléculas orgânicas formadas na superfície pelo equilíbrio da estrutura com mínima energia livre na superfície. Multicamadas são camadas desordenadas devido ao crescimento descontrolado originado das reações e interações rápidas. As monocamadas promovem um alto nível de controle em composição à nível molecular. Entretanto, o grau de ordenação nesse sistema é altamente determinado pelo comprimento da rede alcana. Além disso, existem diversos parâmetros que podem influenciar a formação preferencial de uma camada simples ou multi, tais como: tempo de deposição, mecanismos de adsorção e arquiteturas moleculares (TRINO et al., 2018).

Monocamadas orgânicas são funcionalizadas na superfície de TiO₂ principalmente devido a: mudar a molhabilidade da superfície, modificar a biocompatibilidade, obter sensores

químicos ou bioquímicos ou anexar um sistema de injeção eletrônica (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011).

Nesse trabalho, foi estudada a síntese de óxido de ferro e a sua incorporação na superfície da liga de Ti10Mo8Nb anodizada, formando um filme na superfície da amostra. O filme foi modificado com grupos bifuncionais, de maneira a formar materiais funcionais híbridos. As moléculas utilizadas foram APPA e MPA e suas ligações podem ser observadas na Figura 10. Conforme estudos de Trino et al. (2018), a molécula APPA liga-se à superfície da amostra preferencialmente por grupos -COOH, de maneira mono ou bidentada, formando monocamadas ou multicamadas. Ainda, concluíram que a adesão das moléculas MPA ocorrem em geral pelo grupo mercapto que também podem formar monocamadas ou multicamadas .

Figura 10 – Possível modelo esquemático da ligação de moléculas bifuncionais:
a) APPA e b) MPA.



Fonte: Adaptado de Trino et al. (2018).

2.6 ANÁLISE DA ADESÃO DE BACTÉRIA

Infecções devido as bactérias têm sempre sido um problema para implantes metálicos desde que introduzem um material estranho dentro do corpo humano. Há sempre um risco para o implante resultar em colonização de bactérias e infecção, que, portanto, seria um dano à saúde do paciente. A colônia de bactérias em tecidos locais é um sério problema e, assim, a modificação de superfície no implante do metal têm sido de grande valia às pesquisas médicas (A. GHAVAMINEJAD, L. AGUILAR, R. AMBADE, S. LEE, C. PARK, 2015).

De acordo com Alves Claro et al. (2018), a rugosidade da superfície do biomaterial é benéfica para a osseointegração e ancoragem do osso em implantes (MINAGAR et al., 2013). Entretanto, pode induzir adesão bacteriana na superfície, sendo que as bactérias podem formar um biofilme que age como intermediário fornecendo nutrientes às bactérias (HASAN; CRAWFORD; IVANOVA, 2013). Estudos recentes relacionados à modificação de superfície em ligas apresentaram melhora na adesão celular quando comparada à outras técnicas de incorporação de nanopartículas bactericidas (ZHONG et al., 2014).

A infecção associada ao biomaterial (BAI – *Biomaterial-associated infection*) pode ser desenvolvida a partir da contaminação bacteriana da superfície do implante durante a implantação, imediatamente após a cirurgia e durante a hospitalização ou pelo espalhamento de bactérias oriundas de infecções de outras partes do corpo humano, de acordo com Gristina (1987). De maneira geral, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* são os patógenos mais frequentemente isolados em superfícies de implantes infectados. Em aproximadamente 50% das infecções associadas a cateters, juntas artificiais e válvulas cardíacas são causadas pela *S. epidermidis*, enquanto *S. aureus* é detectada em aproximadamente 23% das infecções associadas a próteses (KHALIL et al., 2007).

A bactéria envolvida no BAI frequentemente se protege contra antibióticos e do sistema imune do hospedeiro produzindo uma matriz que se incorpora nos organismos e é impenetrável para a maioria dos antibióticos e células imunes. Partículas com diâmetros inferiores a 100 nm são consideradas nanopartículas e, como resultado, propriedades tais como área de superfície, reatividade química e atividade biológica alteram drasticamente. Essas características permitem a interação das nanopartículas com as membranas microbianas, prejudicam sua estrutura e inativam as bactérias (MORONES et al., 2005).

Nanopartículas de óxidos metálicos são adequadas como agentes bactericidas, pois podem ser preparados com alta área de superfície e morfologia cristalina com vértices e cantos, além de outros locais potencialmente reativos (STOIMENOV et al., 2002).

Os motivos citados anteriormente juntamente com uma maior expectativa de vida da população, aumenta o interesse em pesquisas sobre materiais que possam substituir alguma deficiência de organismos vivos (CHEN; THOUAS, 2015). As aplicações biomédicas mais relevantes para as ligas de titânio podem ser direcionadas para diminuir as doenças relacionadas ao envelhecimento da população, o qual são caracterizados por dor, incômodo e deficiências (GUPTA; GUPTA, 2005). Assim, é crescente o número de estudos que procuram melhorar as propriedades de superfície dos biomateriais, principalmente aqueles com a função de substituir ou reparar tecidos ósseos.

Aliando as características da liga Ti10Mo8Nb anodizada com as propriedades descritas do óxido de ferro, espera-se potencializar o crescimento ósseo e combinar as técnicas já existentes na literatura. Ainda, visando aumentar a adesão celular, a superfície da liga foi funcionalizada com o ácido 3- 4(aminofenil)propiónico (APPA) e com o ácido 3-mercaptopropiónico (MPA). O desenvolvimento bem-sucedido nesta área ajudará o crescimento na indústria biomédica assim como na melhora da qualidade de vida da população.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Propor método de incorporação de óxido de ferro na superfície da liga Ti10Mo8Nb modificada por oxidação anódica, visando o aumento da osseointegração em materiais para aplicação biomédica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Anodizar a superfície da liga TMN, de maneira a obter camada nanoporosa;
- b) Sintetizar o óxido de ferro usando o método dos precursores poliméricos (Pechini) e verificar o método mais adequado para incorporá-la na superfície da liga TMN anodizada, seja por imersão ou por *spin coating*;
- c) Funcionalizar a superfície das amostras, objetivando aumentar adesão da liga;
- d) Realizar a análise biológica das amostras para verificar a viabilidade na aplicação como biomaterial.

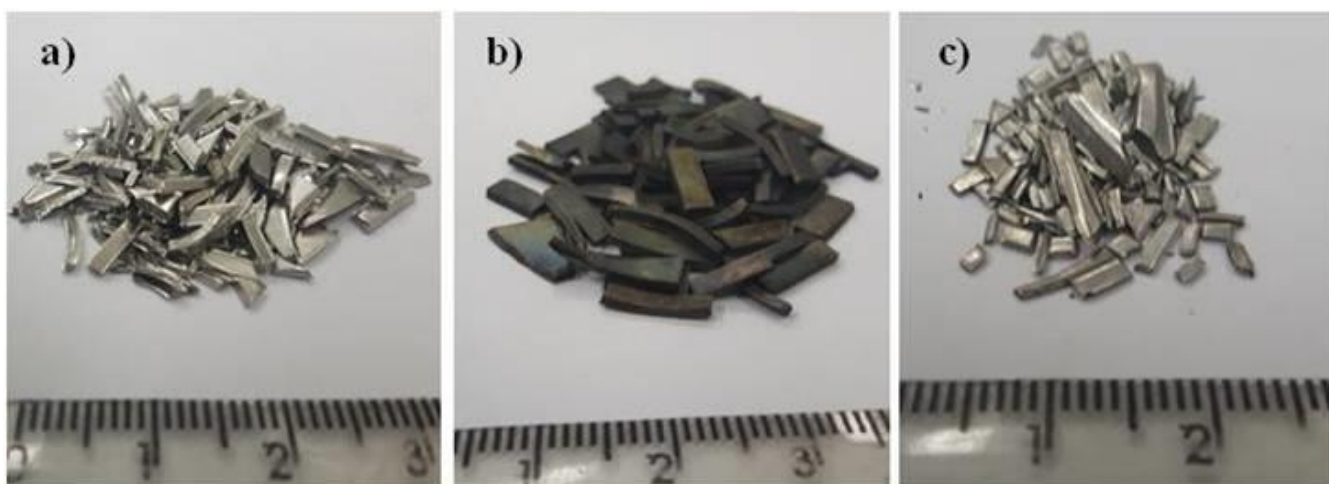
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LIGA Ti10Mo8Nb

4.1.1 Processamento da liga e obtenção das amostras

O processamento da liga foi realizado na Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá – UNESP e Escola de Engenharia de Lorena – USP. Os lingotes da liga Ti10Mo8Nb foram obtidos a partir da fusão de metais comercialmente puros: titânio (grau 2, de acordo com a norma ASTM 6706), molibdênio (99,99%) e nióbio (99,9%). As chapas destes metais foram cortadas, com o auxílio de uma guilhotina, em pedaços de aproximadamente 1,0 cm (Figura 11), os quais foram limpos quimicamente por decação por imersão em uma solução composta por HF (48%) e HNO₃, na proporção 1:3, durante 15 s. A limpeza química é realizada para remoção de impurezas da superfície, como óxidos e resíduos do processamento. Após a limpeza química, os metais foram enxaguados e secos.

Figura 11 – Metais utilizados para preparo da liga: (a) titânio, (b) molibdênio e (c) nióbio.



Fonte: Carobolante (2017).

Os metais foram pesados, em balança analítica, conforme a proporção: 82% Ti, 10% Mo e 8% Nb, em massa. São necessários 3 botões de 25 g para formar um lingote e cada lingote gera aproximadamente 45 amostras de 3 mm de espessura. Os cálculos realizados para pesar cada metal foram:

25 g (1 botão) ----- 100% total

massa Ti -----	82%
massa Mo -----	10%
massa Nb -----	8%

Então, para cada botão de 25 g foram utilizados 20,5 g de Ti, 2,5 g de Mo e 2,0 g de Nb.

Para obtenção da liga foi utilizado um forno a arco voltaico (Figura 12), com eletrodo de tungstênio e cadinho de cobre refrigerado a água e atmosfera inerte (gás argônio, pressão a 1 atm). O forno deve atingir temperatura suficiente para fundir o titânio, o molibdênio e o nióbio e não deve alcançar a temperatura de fusão do tungstênio, ou seja, deve atingir no mínimo 2610°C e no máximo 3410°C. O tempo dentro do forno é de aproximadamente 60 s. Para evitar a oxidação da liga, foi realizado o processo de purga, por pelo menos cinco vezes.

Figura 12 – Forno a arco voltaico utilizado para a obtenção da liga Ti10Mo8Nb.



Fonte: A autoria própria (2019).

A fusão de cada lingote ocorreu em quatro etapas. Durante as três primeiras, foram obtidos três botões de 25 g, e na quarta etapa, os três botões foram unidos formando o lingote. Para garantir que não houvesse inclusões, cada botão foi refundido pelo menos 10 vezes.

Após a fusão, os lingotes foram tratados termicamente em um forno tubular com atmosfera inerte. O primeiro tratamento realizado foi a homogeneização, com o objetivo de garantir a mesma composição em toda a extensão do lingote. A amostra foi inserida no forno em um cadinho de alumina e, em seguida, por meio do processo de purga, com gás argônio, foi

realizado o vácuo no interior no tubo. O material foi aquecido até 1000°C, com uma taxa de aquecimento de 16,5°C/min, mantido nessa temperatura durante 1440 min (24h) e o resfriamento ocorreu lentamente, dentro do forno. O segundo tratamento utilizado foi a solubilização, para estabilizar a fase beta. O lingote foi aquecido até 950°C, à taxa de aquecimento de 16,5°C/min sob vácuo e mantido nesta temperatura por 60 min, seguido de resfriamento rápido, em água com gelo. Após os tratamentos térmicos, o lingote foi forjado a frio em prensa rotativa (DEMAR, EEL-USP), com o objetivo de se obter um formato regular com diâmetro de aproximadamente 10 mm. Em seguida, a barra foi limpa, com água, sabão neutro e acetona e, novamente, realizado o tratamento térmico de solubilização, para garantir a presença da fase β . As barras de Ti10Mo8Nb foram cortadas em discos diamantados com espessura de 3 mm, utilizando o equipamento da Buehler, modelo ISOMET 4000.

4.1.2 Preparação do substrato e oxidação anódica

Os discos da liga TMN foram lixados com lixas abrasivas de granulação 100, 220, 320, 400, 600, 1000 e 1200. Posteriormente, foram lavadas com água destilada e banho ultrassônico com água deionizada por 10 min.

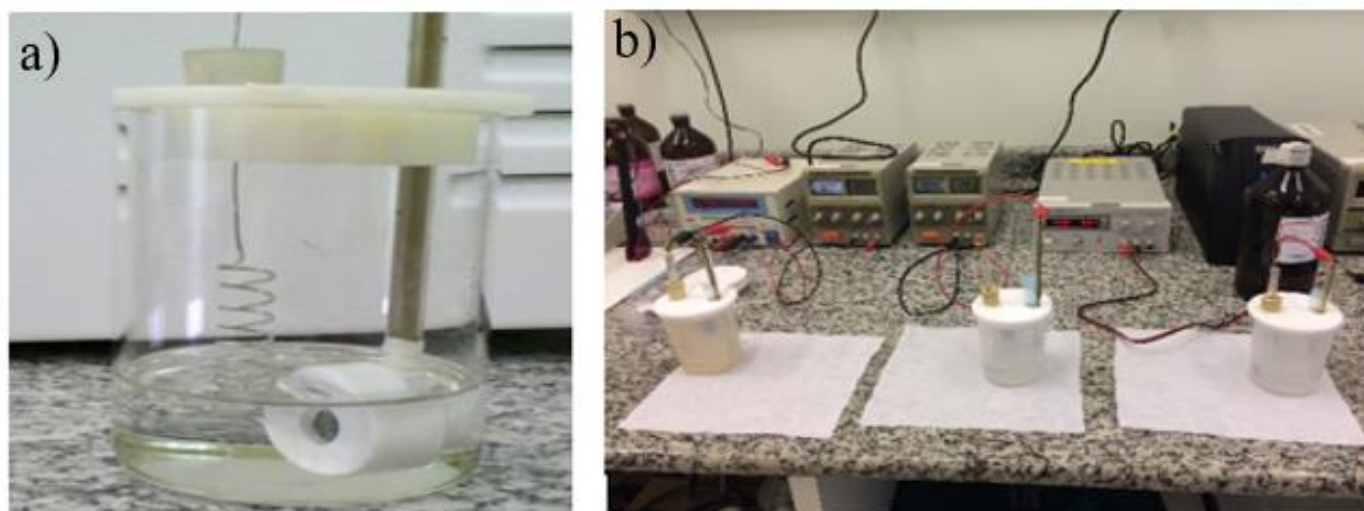
As amostras foram submetidas à oxidação anódica de acordo com estudos anteriores (CAROBOLANTE, 2017), com os seguintes parâmetros: tensão 20 V (200 mV/s) por 180 min (3h), aumentando a tensão 1 V/10s, corrente zero e eletrólito formado por 1:1 (glicerol: água) e 2,7 g (0,27% m/v) de fluoreto de amônio dissolvido em 1L de água. Os parâmetros empregados na oxidação anódica foram definidos previamente (CAROBOLANTE, 2017) e encontram-se na Tabela 1. O eletrólito utilizado é formado por glicerol, NH₄F e H₂O. As amostras foram levadas para a célula e conectadas a uma fonte de alimentação (anodo) e uma rede de platina (catodo, Figura 13). Após o término da anodização, as amostras foram lavadas com água destilada, levadas ao ultrassom por 5 s em água destilada e secas naturalmente.

Tabela 1 - Parâmetros empregados na anodização da liga Ti10Mo8Nb.

Liga	Parâmetros de Anodização		Eletrólito (1L)
	Tensão (V)	Tempo (h)	
Ti10Mo8Nb	20	3	500 mL glicerol, 500 ml H ₂ O destilada e 2,7g NH ₄ F

Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 13 – a) Célula empregada na anodização das amostras e b) Esquema da célula com a fonte.



Fonte: Autoria própria (2019).

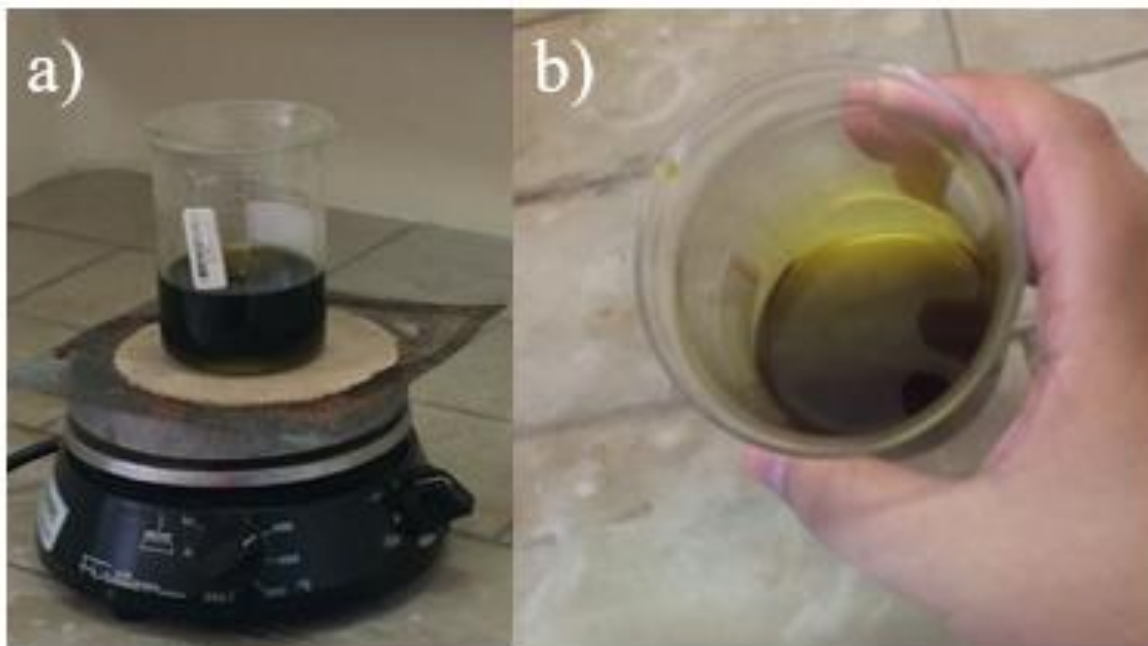
Após, um grupo de amostras que foi utilizado como controle foi calcinado em um forno tipo mufla, a uma temperatura de 450°C, com uma taxa de aquecimento de 5°C/min, por 60 min (1h) para converter a fase amorfa do TiO₂ em fase cristalina (anatase). O resfriamento ocorreu lentamente dentro do forno. Por fim, as amostras calcinadas e as amostras apenas anodizadas foram mantidas no dessecador, sob pressão de -400 mmHg até o momento das análises.

4.2 ÓXIDO DE FERRO

4.2.1 Síntese do óxido de ferro

O óxido de ferro foi sintetizado pelo método dos precursores poliméricos (método Pechini). Os reagentes utilizados foram citrato de amônio e ferro III (C₆H₁₁FeNO₇), ácido cítrico (C₆H₈O₇) e etilenoglicol (C₂H₆O₂), seguindo uma relação molar de 1, 4 e 16, respectivamente (CILENSE et al., 2003). Os cálculos realizados na pesagem dos reagentes estão descritos no Apêndice.

Figura 14 – a) Solução no agitador magnético e b) Solução com viscosidade desejada.



Fonte: Autoria própria (2019).

A solução aquosa do citrato foi preparada dissolvendo o ácido cítrico em um mínimo volume de água deionizada. Então, o sal catiônico (citrato de amônio e ferro III) foi adicionado em proporção estequiométrica à solução ácida e mantida no agitador magnético por 10 min, a uma temperatura de 80°C. A relação molar utilizada foi de 1 mol de citrato de amônio e ferro III para 4 mol de ácido cítrico para 16 mol de etilenoglicol. Após a dissolução completa dos sais metálicos, o etilenoglicol foi adicionado, permanecendo no agitador magnético por mais 10 min, à mesma temperatura (Figura 14a).

O ácido cítrico complexa os íons metálicos e a polimerização foi promovida pelo etilenoglicol por meio da remoção de água com aquecimento no agitador magnético (ORTEGA et al., 2014). A solução foi aquecida a 80°C no agitador magnético até que estivesse viscosa o suficiente (Figura 14b), mudou a coloração e tornou-se uma resina.

4.2.2 Análise do comportamento reológico da resina polimérica

Para verificar a viscosidade da resina, utilizou-se o viscosímetro Brookfield, modelo DV-II+Pro, programa *Rheocalc V3.1-1* (Figura 15), o qual está acoplado a um computador 486 e ao programa Rheowin. Uma quantidade da resina polimérica é colocada dentro de um copo, na qual se coloca um *spindle* (agitador que movimenta a resina). Para a realização das medidas

utilizou-se o *spindle* SC4 - 27 e trabalhou-se com uma velocidade de 150 rpm a temperatura ambiente.

Figura 15 – Equipamento utilizado para verificar a viscosidade da resina polimérica - viscosímetro Brookfield/ DV-II+Pro.



Fonte: Autoria própria (2019).

A viscosidade é a principal propriedade reológica de um fluido porque quantifica a fricção interna do mesmo. Quanto maior a fricção interna, maior será a energia requerida para movimentar uma camada do fluido em relação à outra, resultando em maior dissipação de energia (RAMESH et al., 2011). A análise da viscosidade da resina polimérica que será utilizada no método *spin coating* é importante para evitar trincas no filme fino.

4.2.3 Obtenção do pó cerâmico (óxido de ferro)

A mistura viscosa foi termicamente tratada de maneira a obter-se a esponja (*puff*), a uma temperatura de 300°C, a uma taxa de aquecimento de 3°C/min e um patamar de 4 h (Tabela 2). O resfriamento foi lento, dentro do forno tipo mufla.

Com o objetivo de verificar qual a melhor temperatura de cristalização do *puff*, no qual há formação de fase pura de hematita, realizou-se a análise termogravimétrica (TG). A termogravimetria consiste em medir a variação de massa da amostra em função da temperatura, a uma taxa constante de aquecimento, permitindo acompanhar o comportamento térmico das amostras por reações que envolvam variação de massa. Os resultados são apresentados pela curva termogravimétrica (TG), que pode auxiliar nas conclusões sobre a composição dos resíduos (SIMÕES et al., 2005). A análise de TG foi realizada na UNESP/FEG, com o equipamento SII Nanotechnology – Seiko Model TG/DTA 6200. A taxa de aquecimento utilizada foi de 5°/min, em ar sintético, com temperatura de 30 a 1000°C, massa da amostra de 10 mg, fluxo de nitrogênio de 100 mL.min⁻¹ e alumina como material de referência.

Após análise dos resultados da termogravimetria, foram avaliadas 3 temperaturas para obter a hematita: 500 °C, 550 °C e 600 °C. Assim, os pós foram calcinados em forno mufla e resfriados dentro do forno, nas condições da Tabela 2.

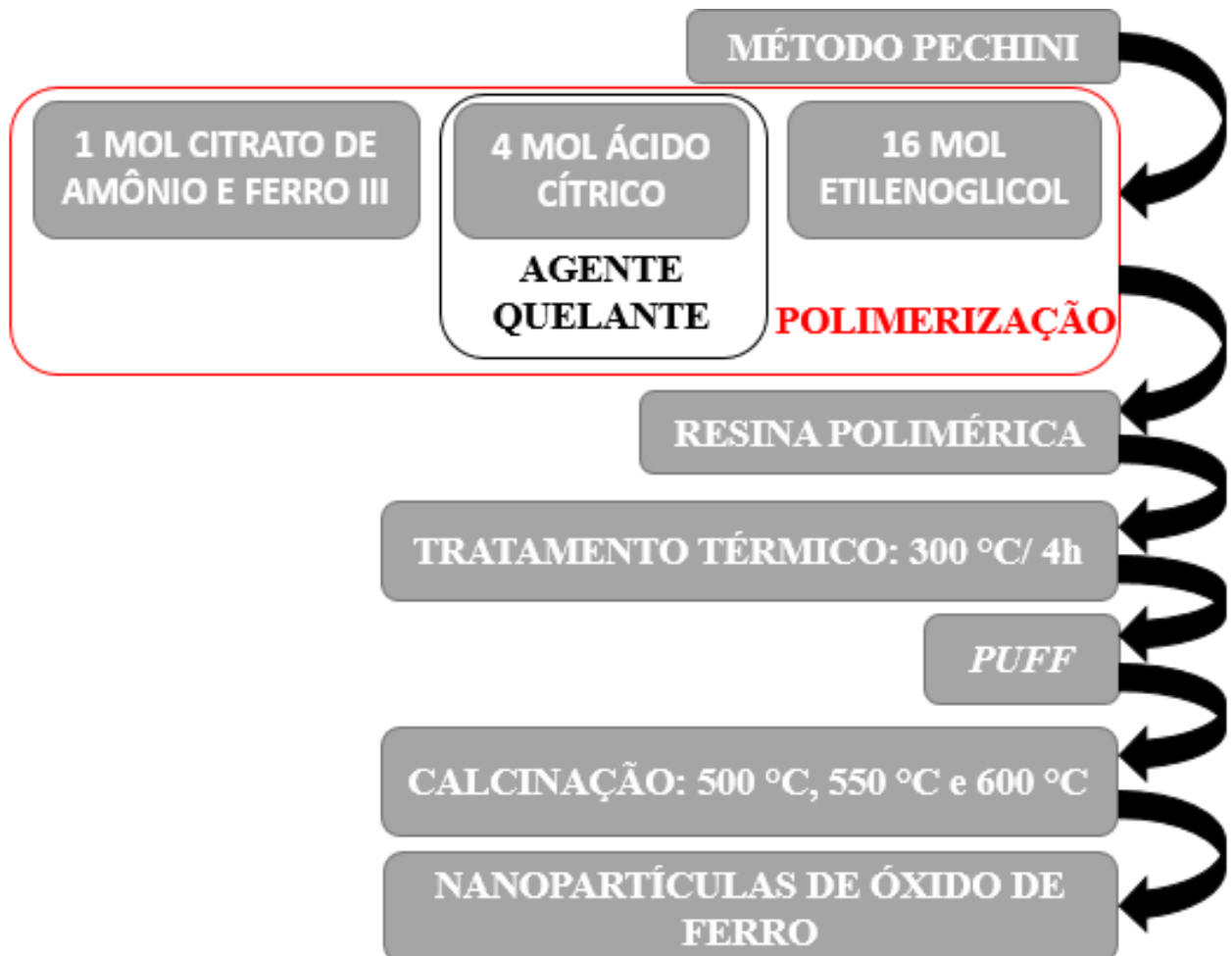
Tabela 2 - Parâmetros de tratamento térmico dos pós cerâmicos.

Parâmetros	Temperatura Inicial (°C)	Temperatura Patamar (°C)	Tempo (min)	Taxa de Aquecimento (°C/min)
<u>Rota 1:</u> Resina Formação do <i>puff</i>	Ambiente	300 ± 2	240	3
<u>Rota 2:</u> <i>Puff</i> Eliminação de compostos orgânicos e formação de pó cerâmico	Ambiente	350 ± 2	60	5
<u>Rota 2:</u> <i>Puff</i> Cristalização do pó cerâmico	350	500 ± 2 550 ± 2 600 ± 2	120	5

Fonte: Autoria própria (2019).

A Figura 16 expressa o esquema utilizado para obter a hematita:

Figura 16 – Fluxograma do procedimento experimental para obtenção do óxido de ferro pelo método dos precursores poliméricos (método Pechini).



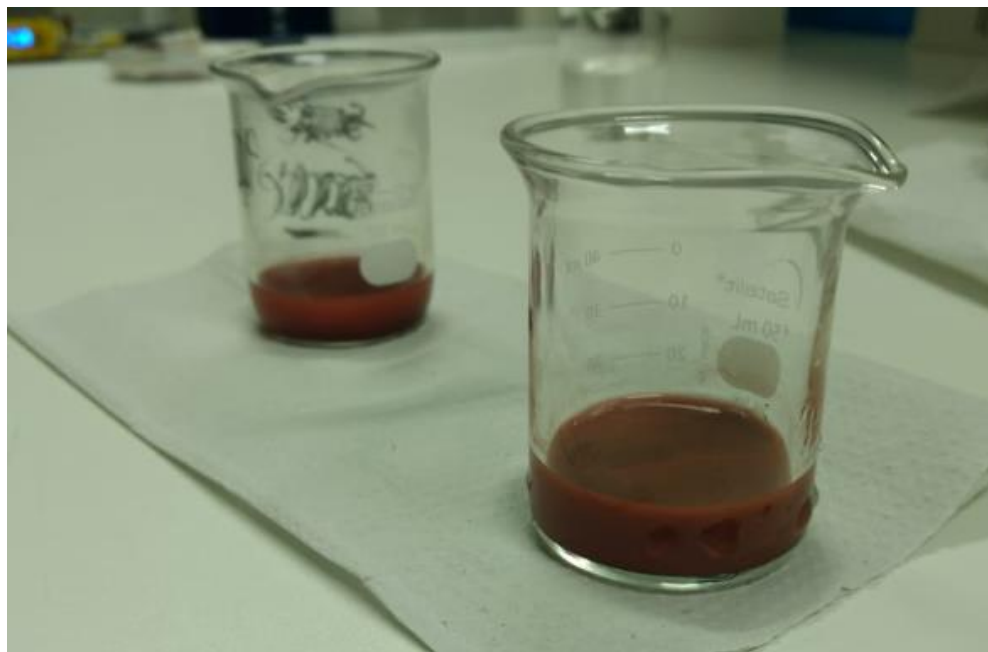
Fonte: Autoria própria (2019).

4.3 INCORPORAÇÃO DE ÓXIDO DE FERRO NA SUPERFÍCIE DA LIGA Ti10Mo8Nb

4.3.1 Incorporação do óxido de ferro por imersão

A técnica de imersão foi realizada com as amostras anodizadas da liga TMN e o pó cerâmico de hematita, sendo que a hematita foi dispersa em etanol e a amostra da liga foi imersa na solução por 10 min (Figura 17). Depois, a amostra foi lavada em água destilada.

Figura 17 – Deposição por imersão: amostras da liga experimental de Ti10Mo8Nb imersas em solução de óxido de ferro.



Fonte: Autoria própria (2019).

A quantidade de hematita utilizada na imersão foi calculada a partir da concentração de 0,01 molar e 10 mL de solução por amostra, segundo estudo depositando prata (ALVES CLARO et al., 2018). Então, por exemplo a cada 5 amostras de TMN, foram utilizados 50 mL de etanol. Assim, a massa de hematita necessária é:

$$m = \text{concentração} * \text{massa molar} * \text{volume} \quad (5)$$

$$m = 0,01 \text{ mol/L} * 159,69 \text{ g/mol} * 0,05 \text{ L} \quad (6)$$

$$m = 0,080\text{g} \quad (7)$$

Portanto, a cada 50 mL de solução foi utilizado 0,080 g de hematita.

Após a imersão, as amostras foram tratadas a uma taxa de 3°C/min, da temperatura ambiente até o primeiro patamar de 350°C, mantido por 60 min (1 h), seguido de aquecimento até 500°C, em um patamar durante 120 min (2 h). As amostras foram resfriadas lentamente dentro do forno mufla. O tratamento térmico foi realizado com o objetivo de eliminar compostos orgânicos oriundos da deposição por imersão e também para calcinar a amostra,

sendo que a camada de dióxido de titânio ainda está amorfa e para a aplicação desejada é necessário que seja cristalina.

4.3.2 Deposição do óxido de ferro por *spin coating*

Na deposição via química pela técnica de *spin coating*, a solução é gotejada sobre o substrato, espalhando uniformemente a solução em sua superfície e formando um filme amorfo (KO et al., 2011). A deposição da solução foi realizada com o equipamento *spin coating* de marca Laurell e modelo WS-400BZ-6NPP/LITE (Figura 18a), conectado a um compressor Edwards/AV3 (Figura 18b), nas amostras da liga TMN e a resina formada pela técnica Pechini.

Foram avaliadas duas condições:

- a) 5000 rpm, 3 camadas;
- b) 5000 rpm, 5 camadas.

Entre as deposições, as amostras foram aquecidas por 5 min em uma chapa aquecedora Marconi/ MA-038 a 150°C. E a cada repetição foi mantido por 60 s no *spin coating*.

Figura 18 – a) Equipamento do *spin coating* e b) Compressor.



Fonte: Autoria própria (2019).

Após as deposições de óxido de ferro na superfície da liga de Ti10Mo8Nb, as amostras foram tratadas a uma taxa de 3°C/min, da temperatura ambiente até o primeiro patamar de 350°C, mantido por 60 min (1h), seguido de aquecimento até 500°C, conforme estudo realizado e discutido no item 5.2.1, em um patamar durante 120 min (2h). As amostras foram resfriadas lentamente dentro do forno mufla.

4.4 DEPOSIÇÃO DAS MOLÉCULAS ORGÂNICAS NA SUPERFÍCIE DA LIGA

As amostras após a incorporação de óxido de ferro na superfície da liga Ti10Mo8Nb por meio do método *spin coating* com 5 camadas foram funcionalizadas com duas moléculas bifuncionais distintas: ácido 3-(4-aminofenil)propiónico (APPA, Aldrich) e com o ácido 3-mercaptopropiónico (MPA, Aldrich). A funcionalização das amostras foi realizada na Faculdade de Ciências da UNESP, campus de Bauru. A deposição foi realizada pelo método de imersão (Figura 19), usando a seguinte metodologia:

a) APPA: Solução APPA de 2 mM foi preparada em etanol (*Merck*), utilizando o agitador magnético por 5 min para dissolver a solução. Após a completa dissolução, a solução foi aquecida a 40°C e o substrato foi imerso por 5 min.

b) MPA: Solução aquosa de 1 mM foi preparada com MPA, ajustando o pH da solução com HCl (*Synth*, pH = 3). As amostras foram imersas por 10 min na solução, à temperatura ambiente.

Figura 19 – Funcionalização das amostras da liga Ti10Mo8Nb anodizadas e incorporadas com óxido de ferro por meio do método *spin coating* (5 camadas).



Fonte: Autoria própria (2019).

Após a deposição das moléculas orgânicas, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas em condição ambiente por uma noite.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.5.1 Caracterização da superfície da liga TMN

A morfologia da superfície das amostras foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando um MEV TESCAN/ MIRA 3 do INPE em São José dos Campos. As amostras analisadas foram divididas em 4 grupos: liga TMN calcinada, liga TMN com incorporação de óxido de ferro, liga funcionalizada com APPA e liga funcionalizada com MPA, sendo divididas em 2 subgrupos: deposição de óxido de ferro com 3 e 5 camadas. Na amostra da liga experimental de TMN calcinada, foi verificada a formação de nanoporos na superfície da liga TMN após anodização. Nas demais amostras, observou-se as nanopartículas de hematita depositadas na superfície da liga e as camadas de deposição e funcionalização.

As medidas do ângulo de contato das superfícies foram realizadas em um goniômetro automatizado, DSA Kruss 100S. A molhabilidade foi investigada empregando o método de gota séssil, onde uma agulha dispensa o líquido sobre a superfície e um programa de computador determina o ângulo entre a gota do líquido e a superfície. A característica hidrofílica é identificada quando o ângulo é menor que 90° e a característica hidrofóbica quando o ângulo é maior que 90° .

As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, com gotas de $2 \mu\text{L}$. De maneira a obter-se uma média dos valores do ângulo de contato, três gotas foram depositadas em regiões diferentes da superfície da amostra e o ângulo de contato foi medido em cada região. Essas medidas foram realizadas no Departamento de Materiais e Tecnologia, Faculdade de Engenharia – UNESP, Campus de Guaratinguetá. As análises de molhabilidade foram realizadas em 2 momentos. Sendo o primeiro grupo para verificar em qual superfície da amostra TMN a hematita se espalha mais, de maneira que seja mais adequado para realizar a deposição (Tabela 3). No segundo grupo foi observado se houve alteração na molhabilidade da superfície da amostra após a deposição de hematita e a funcionalização (Tabela 4).

Tabela 3 - Parâmetros utilizados na medição do ângulo de contato das amostras, considerando ar-resina polimérica-superfície da amostra. Com os grupos: 1) TMN lixada, 2) TMN anodizada e 3) TMN calcinada.

Meio	Condição	Grupos
Sólido	Superfície da amostra	1) Amostra lixada até #1200
Líquido	Resina polimérica	2) Amostra anodizada
		3) Amostra anodizada, após tratamento térmico
Gasoso	Ar	

Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 4 - Parâmetros do ângulo de contato, considerando ar-água destilada-superfície da amostra. Com os grupos: 1) TMN lixada, 2) TMN calcinada, 3) TMN + óxido de ferro (3 camadas), 4) TMN + óxido de ferro (5 camadas), 5) TMN + APPA e 6) TMN + MPA.

Meio	Condição	Grupos
Sólido	Superfície da amostra	1) Amostra lixada até #1200
		2) Amostra anodizada, após tratamento térmico
		3) Amostra após deposição de hematita – 3 camadas
Líquido	Água destilada	4) Amostra após deposição de hematita – 5 camadas
		5) Amostra após funcionalização – APPA
Gasoso	Ar	6) Amostra após funcionalização – MPA

Fonte: Autoria própria (2019).

A espectroscopia de espalhamento Raman foi utilizada para caracterizar a superfície das amostras a médio alcance, analisando as vibrações das ligações químicas e a simetria das moléculas. Esta técnica consiste na análise do espalhamento inelástico da luz monocromática, oriunda de uma fonte de laser, fornecendo informações sobre o grau de desordem da rede cristalina dos materiais (ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013). A espectroscopia Raman foi realizada no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) – São José dos Campos/SP. As medidas das amostras foram realizadas no espectrômetro da marca Horiba Scientific T64000 e modelo LabRAM HR Evolution, acoplado a uma câmera Olympus BX41, utilizando como fonte de excitação um feixe de argônio com 514 nm de comprimento de onda e a medição ocorreu em temperatura controlada a 20°C.

4.5.2 Caracterização do pó cerâmico

Os pós cerâmicos foram analisados usando técnicas como Termogravimetria (TG), difratometria de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Primeiramente, a análise da TG/DTG foi realizada para investigar o comportamento de decomposição do pó precursor do óxido de ferro. A partir de seus resultados pode-se verificar qual temperatura o óxido de ferro estabiliza. Assim, a partir da TG, as análises de DRX e MEV foram divididas em três grupos, conforme temperatura de tratamento térmico do pó, sendo:

- 1) TT 500°C;
- 2) TT 550°C;
- 3) TT 600°C.

A caracterização das fases formadas após o tratamento do *puff* foi monitorada por difratometria de raios X (DRX). Essa técnica é utilizada para determinar as fases presentes, o ordenamento a longa distância e a cristalinidade. O equipamento de marca Bruker e modelo D8 Advance, da UNESP/FEG e o equipamento de marca PANalytical e modelo Empyrean, do Departamento de Engenharia de Materiais da USP/EEL foram utilizados. Possíveis variações na estrutura cristalina da liga foram investigadas com base nos dados de difratometria. Os parâmetros utilizados em ambos os equipamentos foram radiação $\text{CuK}\alpha$, corrente de 25 mA, tensão de 40 kV, passo de $0,02^\circ$, tempo de contagem de 0,25 s, fenda de 6 mm, em um intervalo de medição de 20 a 90° . Os ajustes nos difratogramas de DRX foram realizados no Origin 8.0 e as indexações no Highscore.

A morfologia e o tamanho de grão dos pós cerâmicos encontrados foram avaliados pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O preparo do pó cerâmico para as análises consistiu em dispersar o pó em etanol e realizar banho ultrassônico por 5 min. As micrografias foram realizadas no INPE em São José dos Campos (MEV TESCAN/ MIRA 3).

4.6 ANÁLISE DA ADESÃO DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA

4.6.1 Microrganismo e condições de cultivo

Para este estudo foi utilizada a cepa padrão da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (American Type Culture Collection – ATCC 25922). Antes do início dos experimentos, a bactéria que se encontrava congelada a -80°C , foi reativada em placas de petri contendo Mueller Hinton ágar. As placas foram mantidas em estufa à 37°C por 24 horas, permitindo o

crescimento do microrganismo em colônias. Então, 4 colônias foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB) e este pré-inóculo foi mantido em estufa à 37°C por um período *overnight*. Decorrido esse período, uma alíquota de 1 mL de pré-inóculo foi transferida para um novo tubo tipo falcon contendo 29 mL de meio TSB fresco, formando assim o inóculo. Este inóculo foi mantido em estufa à 37°C por 1,5 horas. Então, o inóculo foi centrifugado nas condições 4000 rpm, 4°C e 10 min; o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com solução salina fosfatada estéril (PBS); esse procedimento foi realizado por duas vezes. Após a última centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em RPMI 1640 suplementado com bicarbonato de sódio e tamponado com hepes.

4.6.2 Ensaio de adesão

Para o teste de adesão, os espécimes foram alocados, em triplicata, em placas de 24 poços, 125 µL do inóculo de *E. coli* foram dispensados sobre os espécimes e, em cada poço, foi acrescido 1 mL de meio RPMI 1640. A placa então foi mantida em agitador orbital (37°C, 75 rpm) por 90 min, tempo correspondente à fase de adesão. Após, todos os espécimes foram lavados com PBS por duas vezes para eliminar as células não aderidas, e então foram alocados em poços limpos contendo 1 mL de PBS. A remoção das células aderidas foi realizada com raspagem dos espécimes com o auxílio de uma ponteira de 200 µL (30 s por espécime). Após a raspagem, todo o conteúdo dos poços foi transferido para microtubos estéreis e foi realizada a diluição seriada seguida de plaqueamento em placas de *petri* contendo *Mueller Hinton* ágar. As placas foram mantidas em estufa à 37°C por 24 h, e então foi realizada a contagem de colônias viáveis.

Também foi realizado o ensaio de metabolismo celular de XTT com as células removidas dos espécimes. Para tanto, alíquotas de 100 µL das células removidas dos espécimes foram incubadas com 100 µL de solução de XTT em placa de 96 poços por um período *overnight*. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca com comprimento de onda de 492 nm.

4.6.3 Microscopia de fluorescência confocal a laser

Para a obtenção das imagens de microscopia de fluorescência confocal a laser o mesmo procedimento de adesão descrito no item 4.6.2 foi realizado. Após a lavagem dos espécimes com PBS (para remoção das células não aderidas), os mesmos foram incubados com 1 mL de

solução de iodeto de propídio e Syto9, provenientes do Kit *Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit* (Invitrogen, ThermoFisher) por 30 min na ausência da luz. Os fluoróforos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Decorrido o período de incubação, os espécimes foram lavados com PBS e levados para análise em microscópio em placa de 24 poços.

4.6.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para a obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura, após o período de adesão das células, os espécimes foram lavados com PBS e então foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% por um período *overnight*. Então, foi realizada a desidratação progressiva dos espécimes com soluções de álcool 70%, álcool 90% e álcool absoluto. Os espécimes foram mantidos em dissecador à vácuo contendo sílica até o momento das análises em microscópio eletrônico de varredura.

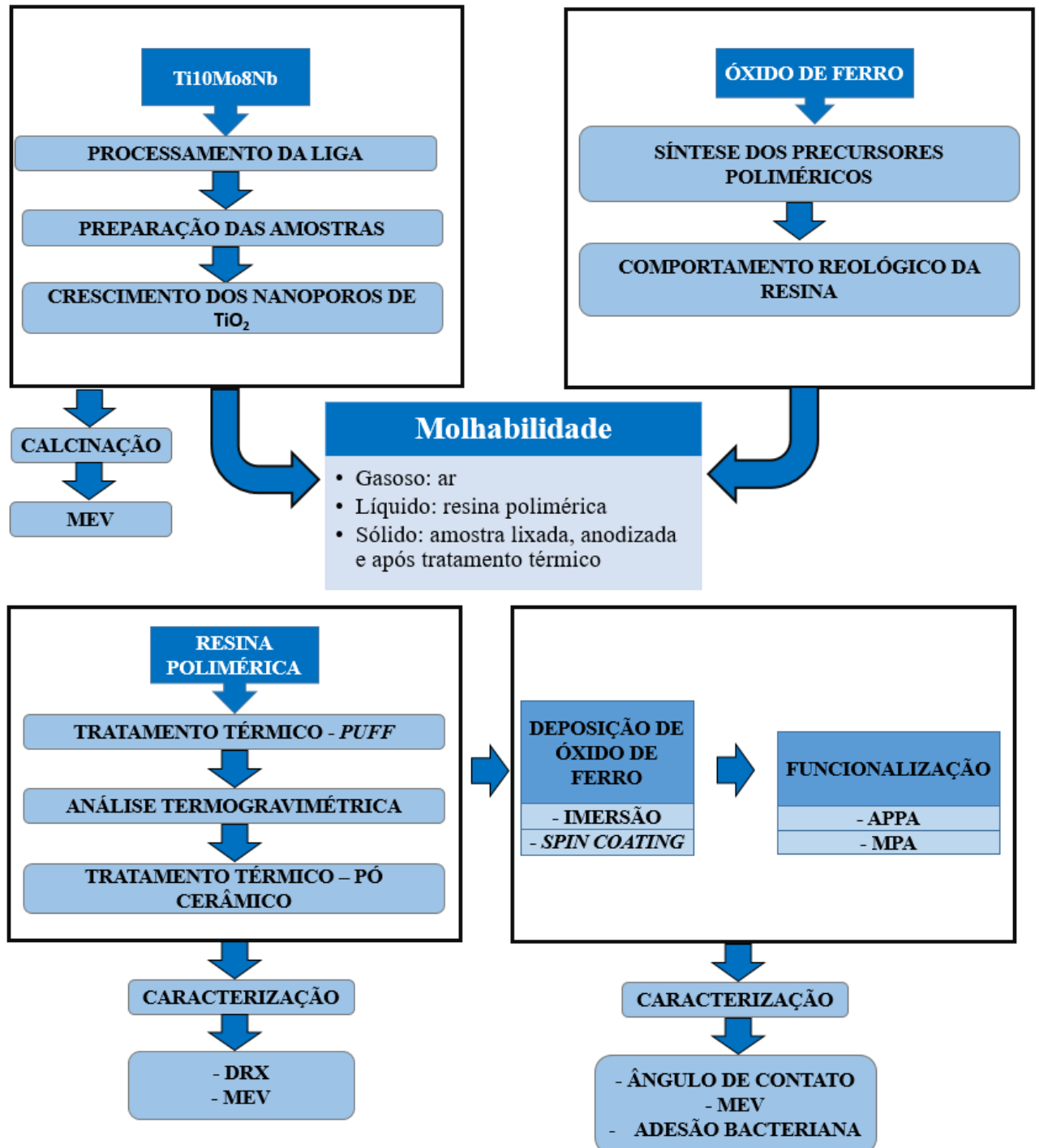
4.6.5 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da contagem do número de colônias viáveis e da absorbância do ensaio de XTT foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade de Levene. Como os dados de $\text{Log}_{10}(\text{UFC/mL})$ apresentaram distribuição normal e desigualdade de variâncias, foi realizado o teste de ANOVA a um fator com correção de Welch, seguido do pós-teste de Games-Howell. Já os dados de absorbância do ensaio de XTT não apresentaram distribuição normal e, portanto, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software IBM SPSS *Statistics Data Editor*.

A Figura 20 apresenta o fluxograma com as etapas empregadas no desenvolvimento dessa pesquisa. Primeiramente, a liga TMN foi processada, obtida e preparada para ser realizada a oxidação anódica. Um grupo destas amostras foi calcinado para ser utilizado como controle nas caracterizações. Após, a resina polimérica foi obtida usando o método dos precursores poliméricos e foi avaliada sua viscosidade. Assim, foi realizada a análise do ângulo de contato para verificar qual superfície é mais adequada para a incorporação de óxido de ferro (Figura 20). Posteriormente, foi realizado tratamento térmico na resina polimérica. Com o *puff* obtido, realizou-se análise termogravimétrica. Após, realizou-se tratamento térmico no *puff* com as temperaturas obtidas no resultado da TG. Com o pó cerâmico, foram realizadas análises com

DRX e MEV. Dois grupos de deposição foram utilizados: imersão e *spin coating*. Depois da deposição, as amostras foram funcionalizadas com APPA e MPA, e por fim caracterizadas. A análise da adesão de bactéria gram-negativa foi realizada ao final do processo.

Figura 20 – Fluxograma da metodologia utilizada nesse trabalho.



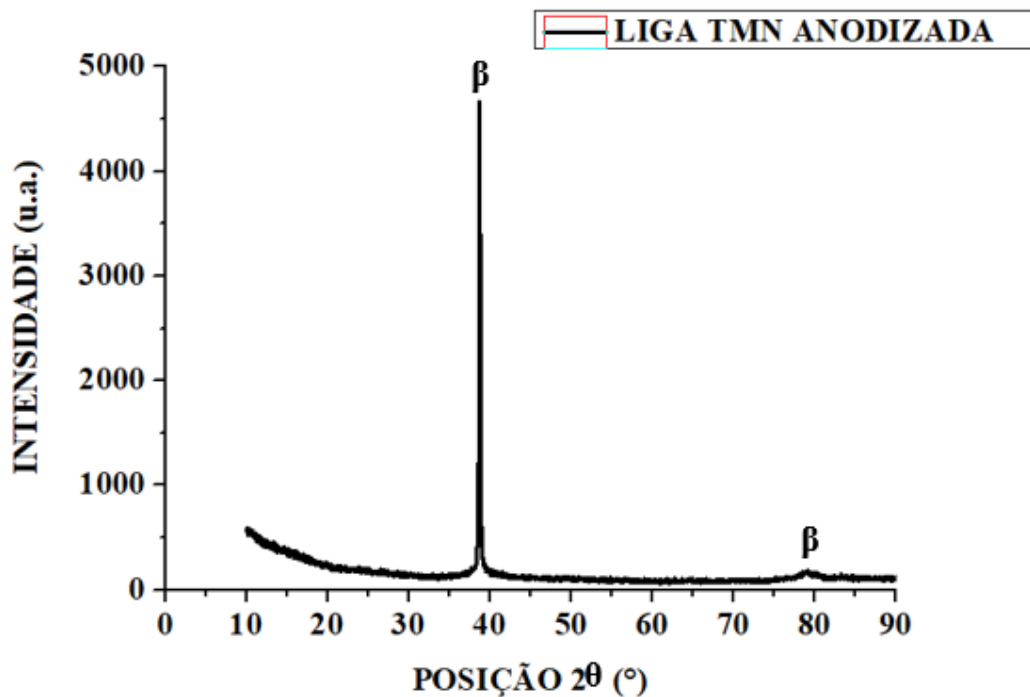
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA LIGA Ti10Mo8Nb ANODIZADA

5.1.1 Difratometria de raios X (DRX)

A partir dos resultados do difratograma de raios X (DRX - Figura 21), com a amostra da liga Ti10Mo8Nb anodizada, pode-se observar picos característicos da fase β , resultado do tratamento térmico e da composição da liga, de acordo com estudos anteriores da liga Ti10Mo8Nb (CAROBOLANTE, 2017; CHELARIU et al., 2014). A característica do difratograma até a posição 20° pode ser relacionada ao porta amostra.

Figura 21 - Difrátograma do *bulk* da liga Ti10Mo8Nb após oxidação anódica.

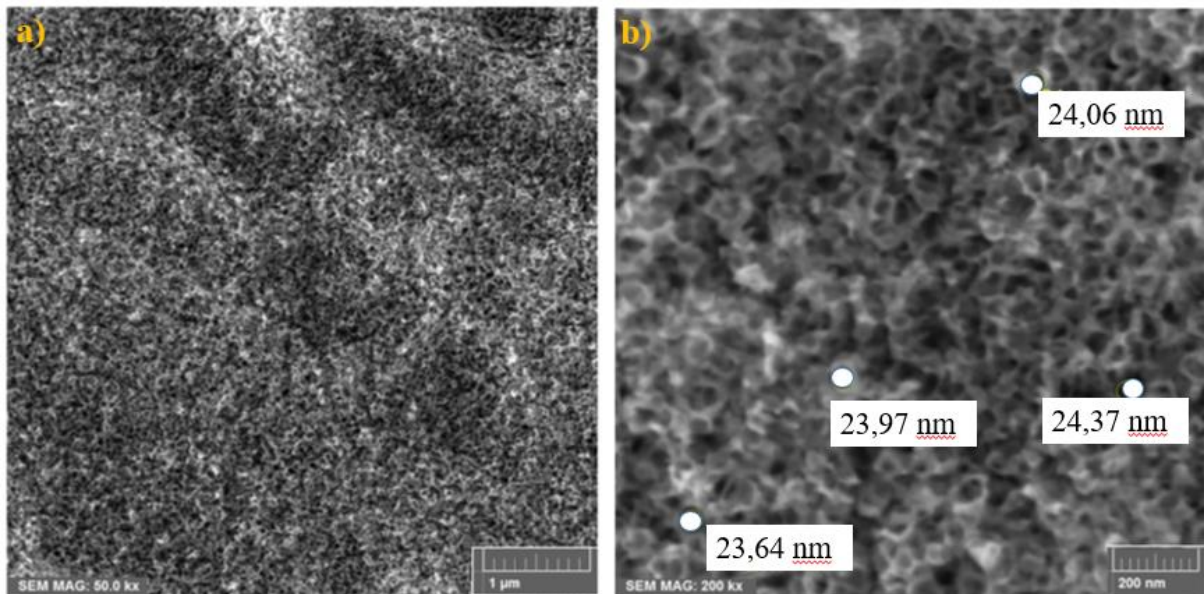


Fonte: Autoria própria (2019).

5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 22 se apresentam as micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície da liga TMN após oxidação anódica em eletrólito, conforme a condição escolhida em estudos preliminares (CAROBOLANTE, 2017).

Figura 22 – Micrografias da superfície da liga TMN após anodização em eletrólito formado por 2,7 g de NH_4F a cada litro da solução glicerol/água (1:1, em volume), sob tensão de 20V durante 3h: a) Ampliação 50kx e b) Ampliação 200kx com medições dos nanoporos.



Fonte: Autoria própria (2019).

O processo de anodização gerou uma camada de dióxido de titânio nanoporosa (Figura 22a), com diâmetro interno médio dos poros de aproximadamente 24,01 nm (Figura 22b), corroborando resultados de estudos anteriores (CAROBOLANTE, 2017). Este resultado é adequado porque superfícies porosas melhoram a bioatividade dos implantes e induzem a osseointegração (KIRMANIDOU et al., 2016). Além disso, superfícies com maior área específica de superfície, com poros de diâmetros nanométricos, tendem a diminuir a adesão bacteriana (LI et al., 2013). Implantes sem porosidade possuem limitações ao induzir regeneração óssea e a fixação do implante (YILMAZ et al., 2018). Esse problema pode ser superado imitando as propriedades físicas (30 - 95% porosidade) e mecânicas (2,3 a 30 GPa módulo de elasticidade) do osso para produção do implante (RAO; CHU; ZHENG, 2014).

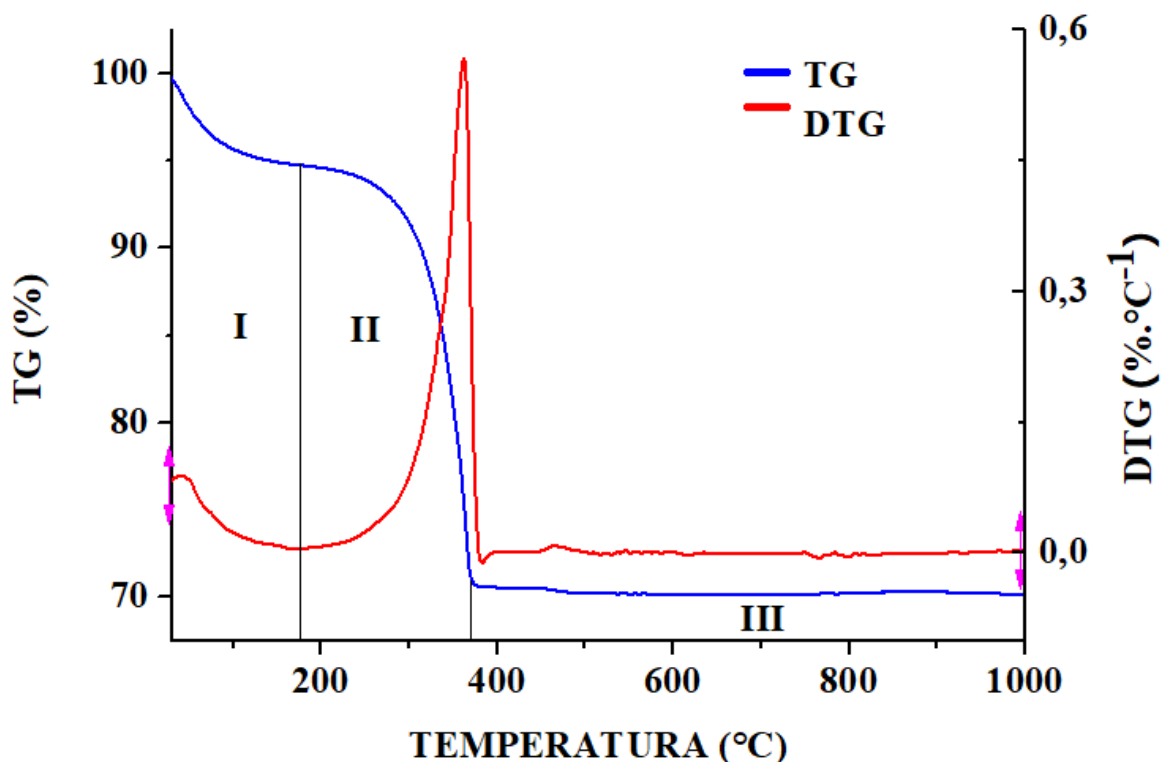
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO PÓ CERÂMICO

5.2.1 Análise termogravimétrica (TG)

Pode-se observar no termograma da Figura 23 que a partir de aproximadamente 400°C a decomposição do pó cerâmico é completada, indicando formação de fases de óxido de ferro. Portanto, foram utilizados tratamentos térmicos a 500, 550 e 600°C, de forma que seja apropriado tanto para a formação de óxido de ferro quanto para a liga de titânio. Considerando

que quando o TiO_2 é formado por meio da oxidação anódica, encontra-se no estado amorfo e torna-se cristalino no tratamento térmico entre as temperaturas de 400 e 600°C, intervalo de temperatura no qual é anatase (MATTLE AND THAMPI, 2013; CORDERO-GARCÍA et al., 2016).

Figura 23 – Resultado da análise termogravimétrica (TG) do pó cerâmico processado pelo método dos precursores poliméricos (método Pechini), com temperatura até 1000°C.



Fonte: Autoria própria (2019).

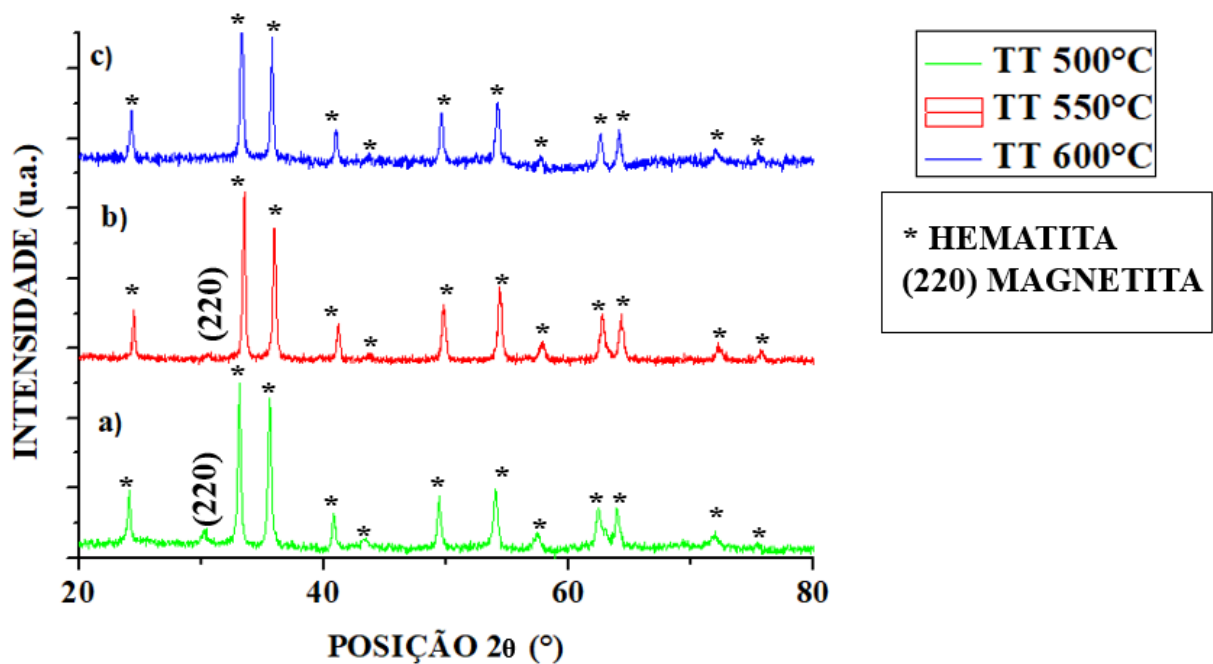
As curvas TG/DTG revelam que a decomposição do pó cerâmico ocorre em 2 etapas distintas de perda de massa. A primeira etapa (região I) ocorre devido à evaporação de água formada durante a reação de esterificação (LIU; TAO; SHEN, 1997; RUFUS; SREEJU; PHILIP, 2019), representando uma perda de massa de aproximadamente 5%. A segunda etapa (região II) é observada de 200 a 380°C, correspondente à decomposição dos derivados do etilenoglicol e do ácido cítrico, com uma perda de massa considerável de 25% (RUFUS; SREEJU; PHILIP, 2019). A curva DTG possui um pico à 380°C, indicando o ponto de inflexão no qual ocorre a máxima perda de massa (MÉNDEZ et al., 2010). Após essa temperatura, cessa a decomposição do pó cerâmico (região III) e formam os óxidos de ferro, indicando a melhor temperatura de cristalização.

5.2.2 Difractometria de raios X (DRX)

A difratometria de raios X foi realizada nos pós cerâmicos com tratamentos térmicos a 500, 550 e 600°C para analisar as fases cristalinas formadas. Na Figura 24 pode-se observar os difratogramas dos pós cerâmicos com tratamento térmico a (a) 500°C, (b) 550°C e (c) 600°C.

A partir do difratograma da Figura 24a (verde), percebe-se, além dos picos característicos da hematita, existe um pico da fase magnetita, indicado pelo índice de Miller (220), conforme arquivo JCPDS 19-0629. Assim como no difratograma da Figura 24b (vermelho), no qual também aparece a fase secundária de magnetita. No difratograma da Figura 24c (azul), pode-se observar que os picos são característicos do difratograma da hematita pura (PAWAR et al., 2019; RAJENDRAN et al., 2017; REHMAN et al., 2017), correspondente ao arquivo JCPDS 33-0664, desta forma, nesta condição foi obtida a fase (α -Fe₂O₃) pura. A continuação desse trabalho foi realizada utilizando-se tratamento térmico das amostras com os extremos de temperatura, 500°C e 600°C, de maneira a verificar a influência das fases formadas (hematita e magnetita) na deposição da liga TMN e comparando-se os resultados.

Figura 24 - Difratomogramas dos pós cerâmicos obtidos pelo método dos precursores poliméricos (método Pechini), submetidos a tratamentos térmicos a (a) 500°C, (b) 550°C e (c) 600°C.

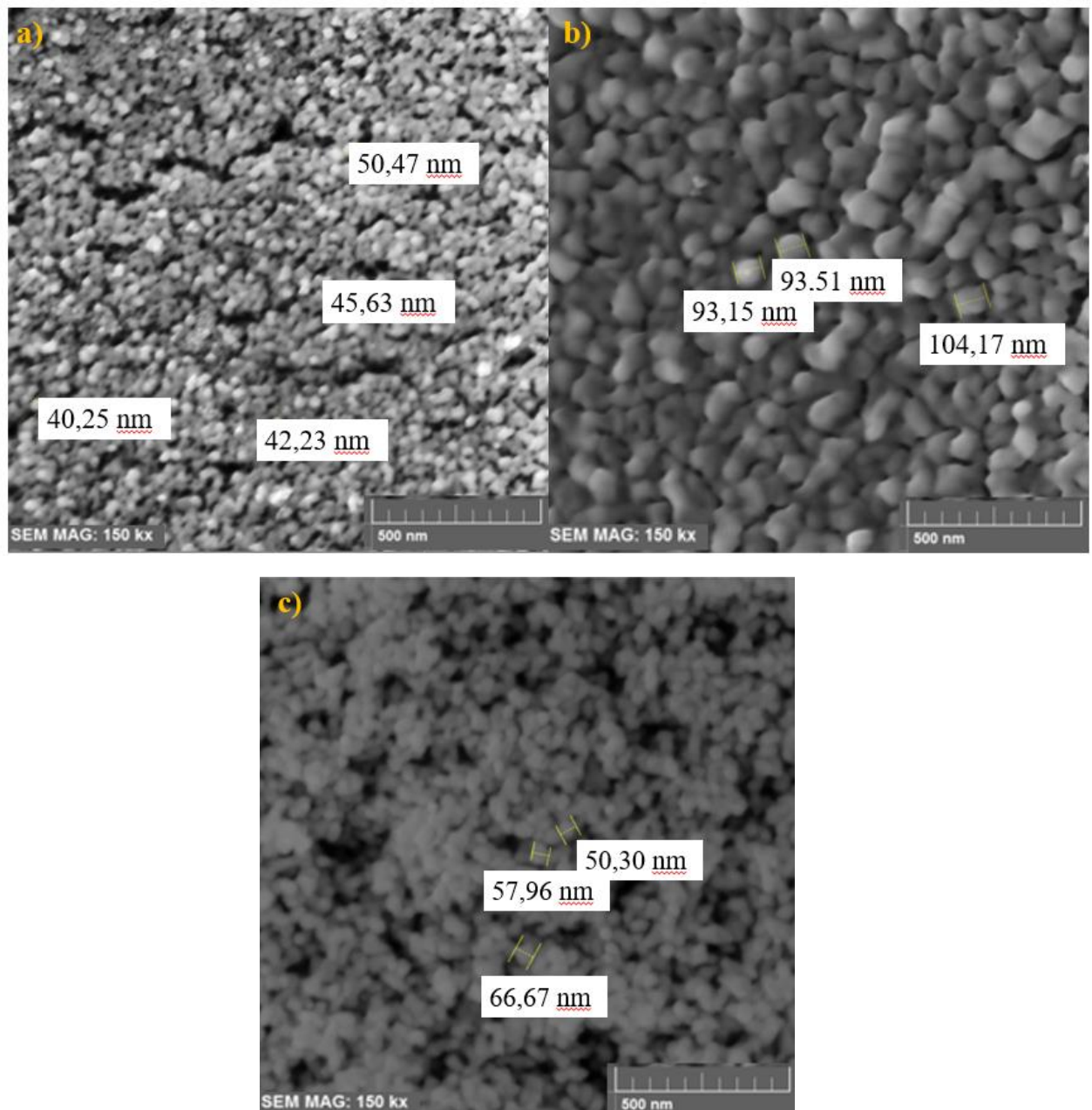


Fonte: Autoria própria (2019).

5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada nos pós cerâmicos em 3 condições de tratamento térmico: 500, 550 e 600°C. O objetivo desta caracterização nos pós cerâmicos foi verificar a morfologia e o tamanho das partículas em cada condição. A partir da Figura 25, pode-se observar as micrografias dos pós cerâmicos com tratamentos térmicos: 500°C, 550°C e 600°C, todas as condições em ampliação de 150kx.

Figura 25 – Micrografias dos nanopós processados pelo método dos precursores poliméricos, após tratamentos térmicos a: a) 500°C, b) 550°C e c) 600°C, ampliação de 150kx.



Fonte: Autoria própria (2019).

A partir das micrografias pode-se observar que os diâmetros equivalentes das nanopartículas dos pós cerâmicos são: 44,65 nm, 95,94 nm e 61,34 nm, respectivamente. Nas micrografias referentes ao primeiro e ao terceiro tratamento térmico (500°C e 600 °C), observa-se um aspecto arredondado das nanopartículas. Nos resultados do segundo tratamento térmico (550°C), observa-se nanopartículas angulares, no qual a textura apresentada é de aglomerados maiores, com maior diâmetro das partículas.

Geralmente, quanto maior a temperatura de tratamento térmico, maiores as dimensões das nanopartículas. Neste caso, o TT a 600°C apresentou nanopartículas com diâmetro menor em comparação ao TT a 550°C provavelmente devido a ser a temperatura no qual há fase única de hematita, diferente das demais temperaturas estudadas, onde há fase secundária. Resumindo, as micrografias apresentadas permitem identificar que as condições de tratamento térmico a 500°C e a 600°C são mais adequadas porque as nanopartículas são mais arredondadas e menores.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA RESINA POLIMÉRICA

5.3.1 Análise do comportamento reológico (viscosidade)

A solução deve ter uma viscosidade entre 15 e 40 mPa.s (SIMÕES et al., 2005; V. ZWILLING A. BOUTRY-FORVEILLE, D. DAVID, M. Y. PERRIN, M. AUCOUTURIER, 1999), de maneira a obter filmes homogêneos e livres de trincas, o valor obtido foi de $22,65 \pm 2,0$ mPa.s. A viscosidade influencia diretamente na espessura do filme, afetando diretamente sua microestrutura e na qualidade final, assim, este parâmetro é crítico para deposição de filmes finos. Com espessuras elevadas é possível induzir trincas no filme durante tratamento térmico. Faz - se, então, necessário o controle deste parâmetro (PUJARI et al., 2014).

5.3.2 Análise do ângulo de contato (molhabilidade)

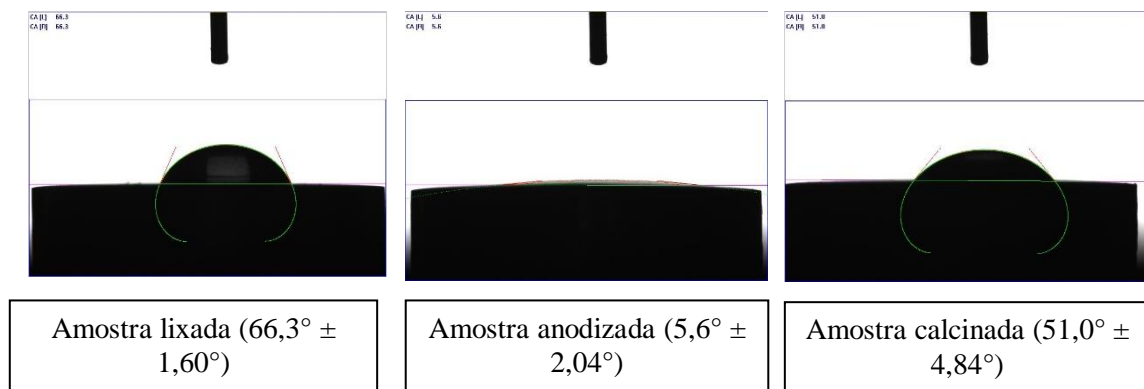
Com o objetivo de verificar a molhabilidade e em qual condição é mais adequada depositar o óxido de ferro na superfície da liga TMN, foi analisada a interação entre a superfície da liga Ti10Mo8Nb e a resina polimérica obtida por meio do método Pechini. A interface gás-líquido-sólido foi ar-resina polimérica-superfície da liga TMN, respectivamente. Foram ensaiadas as superfícies da liga lixada até granulometria 1200, liga anodizada e da liga anodizada seguida de tratamento térmico.

As propriedades de molhabilidade podem ser hidrofóbicas ou hidrofílicas, sendo que as definições são conforme os ângulos de contato encontrados (JIN et al., 2016):

- superhidrofóbico – ângulo de contato $> 150^\circ$;
- hidrofóbico – $90^\circ < \text{ângulo de contato} < 150^\circ$;
- hidrofílico – $10^\circ < \text{ângulo de contato} < 90^\circ$;
- superhidrofílico – ângulo de contato $< 10^\circ$.

A partir da Figura 26 pode-se observar o ângulo de contato da amostra lixada, da amostra anodizada e da amostra calcinada, sendo $66,3^\circ$, $5,6^\circ$ e $51,0^\circ$, respectivamente.

Figura 26 – Resultados obtidos na análise do ângulo de contato, por meio do método de gota sésil, considerando os meios ar, resina polimérica e superfície da liga Ti10Mo8Nb.



Fonte: Autoria própria (2019)

A partir dos resultados, pode-se observar que o ângulo de contato na superfície anodizada é mais de 10 vezes menor que o ângulo nas demais superfícies, isso significa que é mais hidrofílica e melhor para esse trabalho pois a resina se espalha mais na superfície da amostra em relação às demais condições. Assim, ao depositar-se o óxido de ferro na superfície da liga, é favorável para que esta camada fique homogênea e recubra maior área de superfície.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA

5.4.1 Espectroscopia Raman

Na Figura 27, são apresentados os resultados da espectroscopia de espalhamento Raman da a) Liga TMN anodizada, b) Liga TMN com deposição do óxido de ferro (5 camadas) e c) Liga funcionalizada com APPA em comparação à MPA. Na Figura 27^a estão presentes as bandas características da TiO_2 , conforme Chaves et al. (2016) e as bandas 147 , 516 e 634 cm^{-1}

relacionadas à vibração de alongamento simétrico do O-Ti-O $E^1_g(A)$, vibração de flexão antissimétrica $A^1_g(A)$ e $E^2_g(A)$. Além dessas, a banda a 395 cm^{-1} é referente à vibração de flexão simétrica do O-Ti-O (INDIRA; KAMACHI MUDALI; RAJENDRAN, 2017).

A partir da Figura 27b, pode-se observar as bandas Raman do óxido de ferro depositado à liga TMN anodizada. Assim, a banda mais característica da liga mantém-se a 147 cm^{-1} . Em relação ao óxido de ferro, o espectro Raman também pode dar informações em relação à qualidade da amostra e à presença de dopantes (WHEELER et al., 2012). As 5 bandas mais características neste espectro Raman podem ser classificadas em 2 classes de modo vibracional Raman: $A^1_g(A)$ referente à 226 e 497 cm^{-1} e $E^1_g(A)$ referente à 292 , 411 e 612 cm^{-1} , ambas representando a $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (MIRZAEI et al., 2016; REHMAN et al., 2017). Na Figura 27c pode-se perceber que as amostras funcionalizadas permanecem com as mesmas bandas.

Figura 27 - Espectros Raman: a) TMN anodizada, b) TMN + óxido de ferro (5 camadas, *spin coating*) e c) funcionalizada com APPA em comparação à MPA.

(continua)

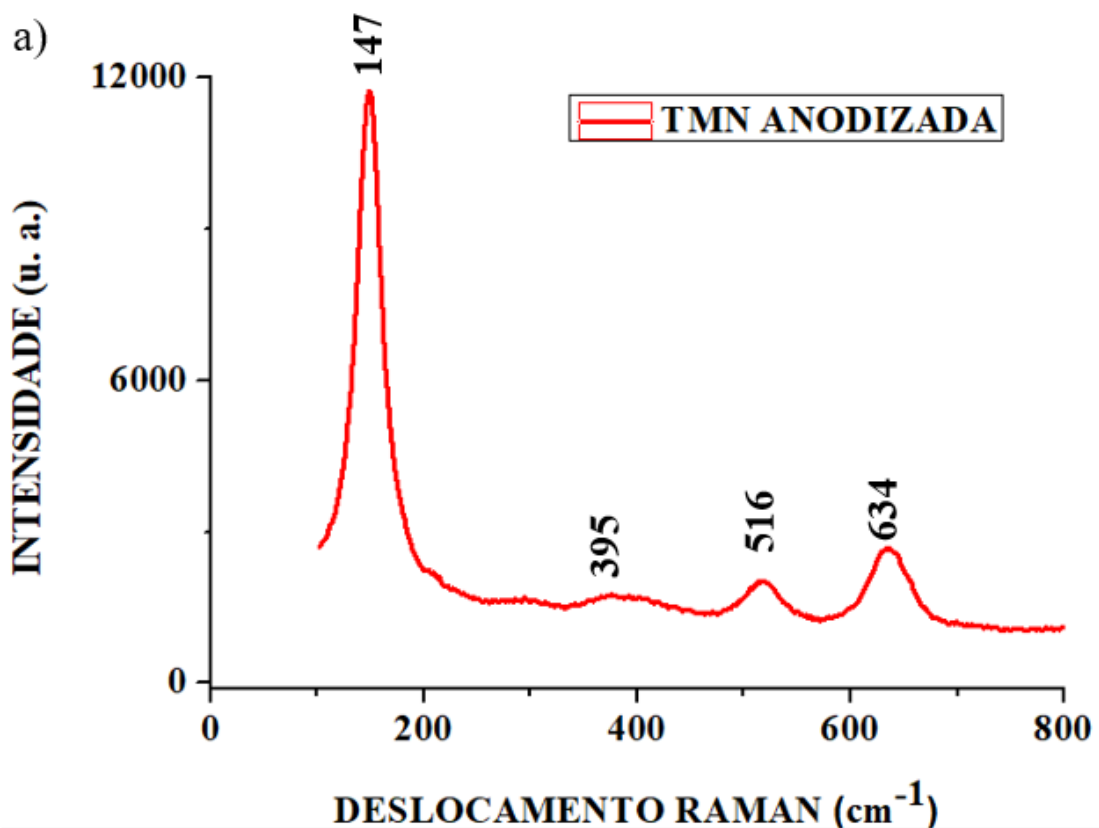
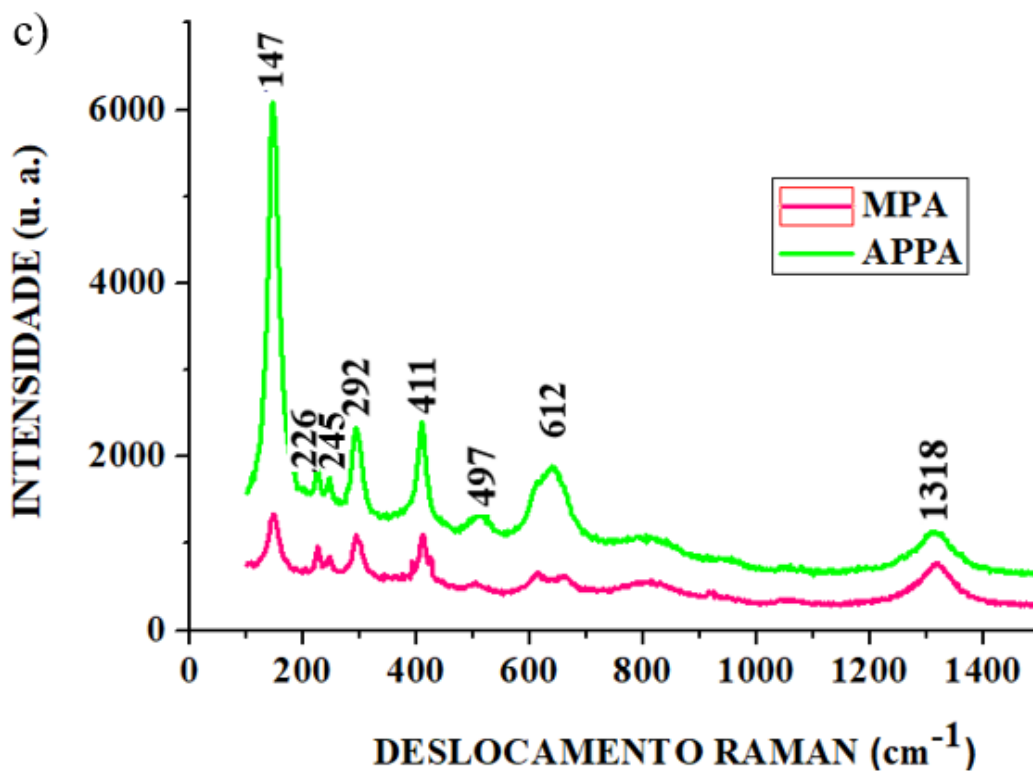
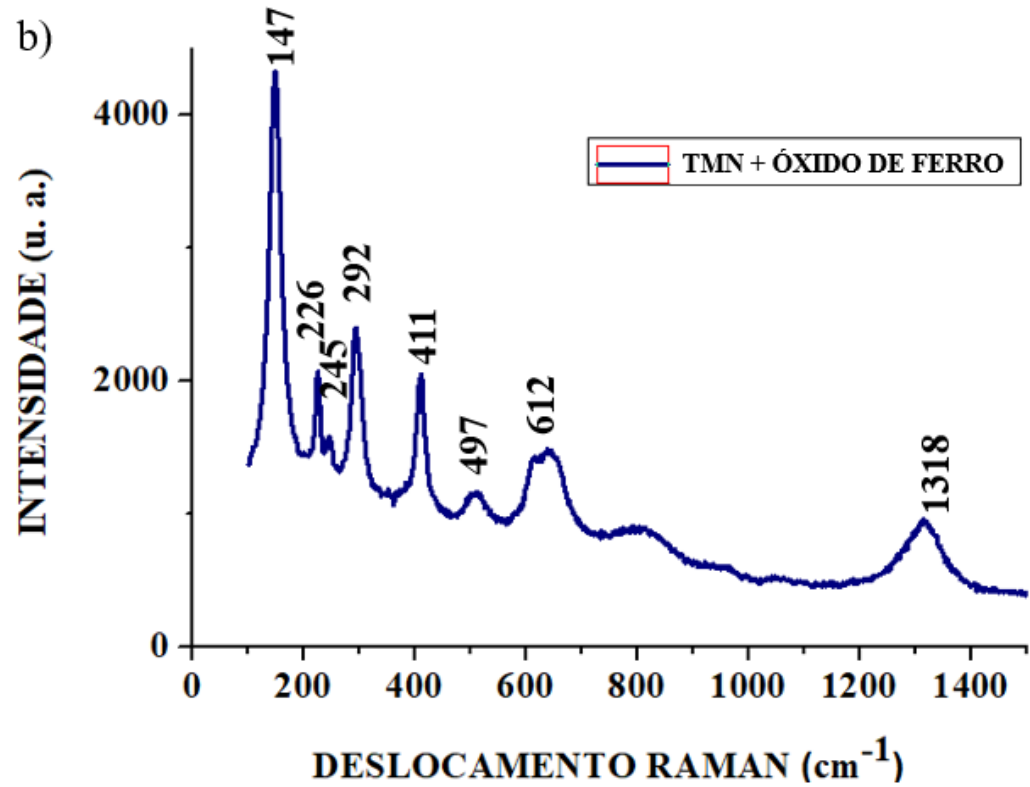


Figura 28 - Espectros Raman: a) TMN anodizada, b) TMN + óxido de ferro (5 camadas, *spin coating*) e c) funcionalizada com APPA em comparação à MPA.

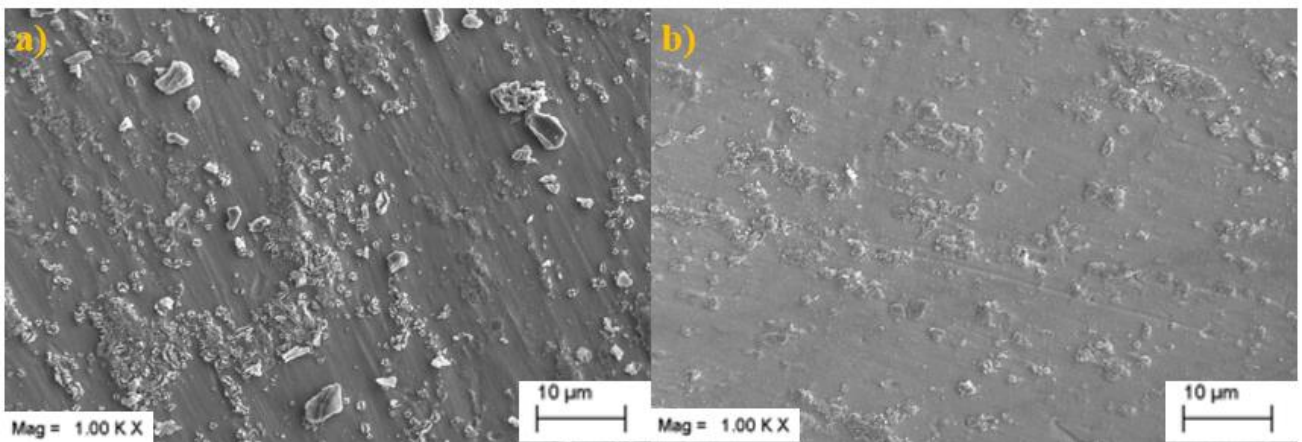
(conclusão)



5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

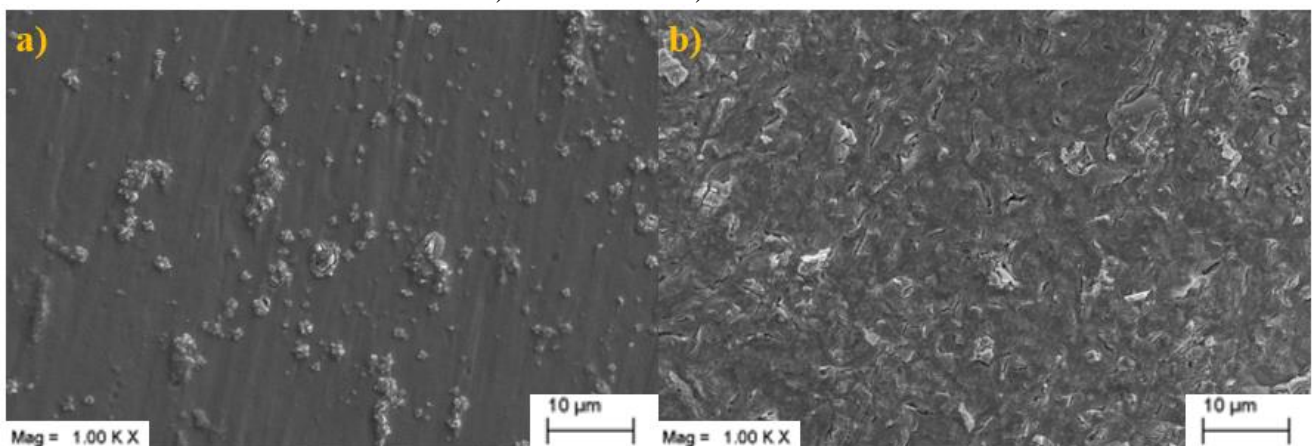
Nas Figuras 28 e 29, se apresentam as micrografias da superfície da liga anodizada, incorporado o óxido de ferro por meio de imersão e por meio de *spin coating*, funcionalizadas, respectivamente. Conforme os resultados obtidos no difratograma de raios X e na microscopia eletrônica de varredura dos pós cerâmicos, a técnica por imersão foi dividida em 2 grupos, sendo os pós cerâmicos tratados termicamente a 500°C e a 600°C.

Figura 29 – Micrografias para as amostras da liga TMN anodizadas e depositadas com hematita por meio de imersão, com diferentes tratamentos térmicos: a) 500°C e b) 600°C.



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 30 – Micrografias para as amostras da liga TMN anodizadas e depositadas com óxido de ferro por meio do *spin coating*, ambos a 5000 rpm, porém com quantidades diferentes de camadas: a) 3 camadas e b) 5 camadas.



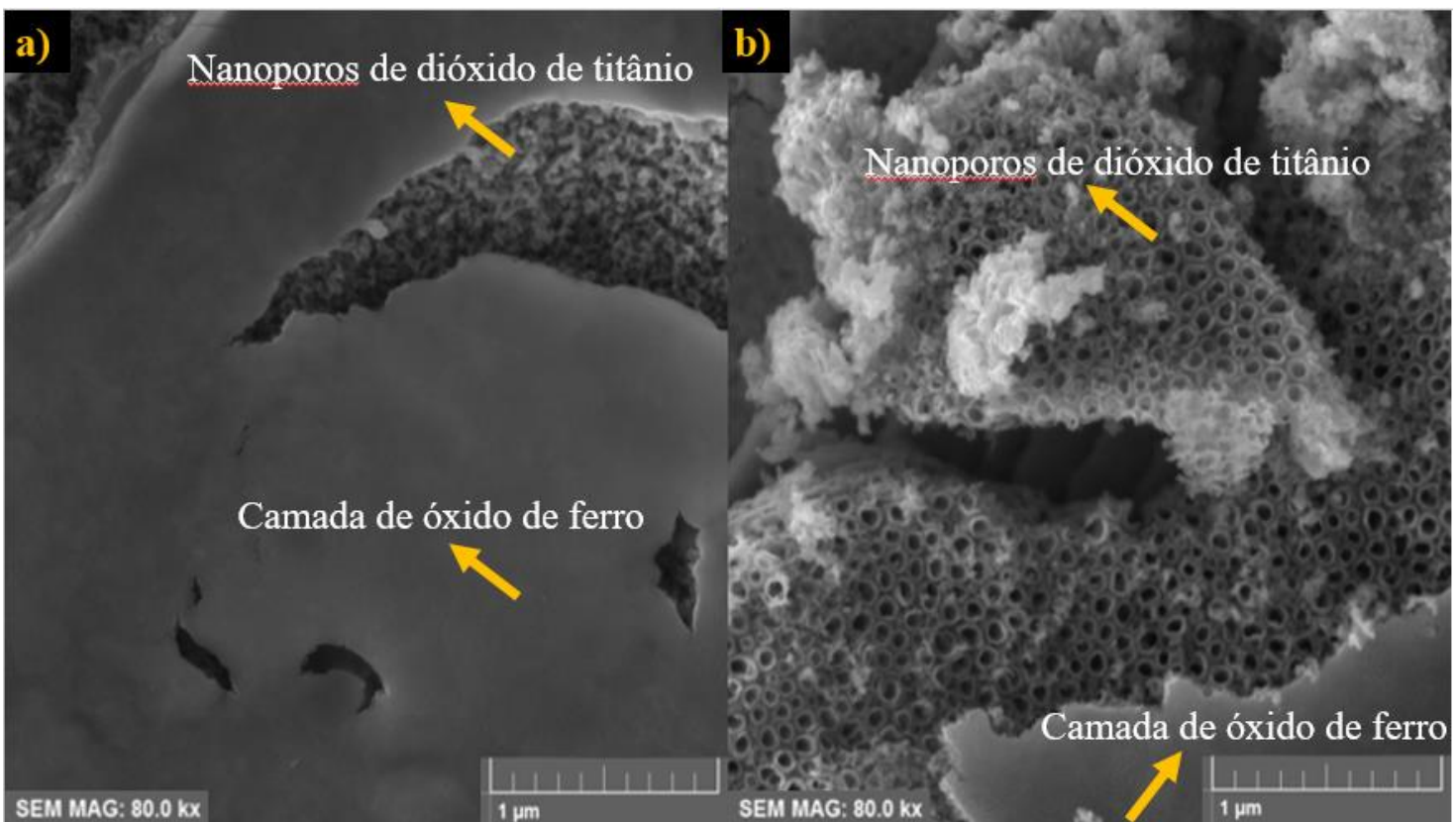
Fonte: Autoria própria (2019).

Na Figura 28, pode-se observar que o TT a 500°C difere do TT a 600°C quanto à microestrutura, sendo que o TT a 500°C formou estruturas maiores e mais aglomeradas. A partir

da microestrutura da Figura 29, observa-se que a condição da Figura 29b está mais homogênea que a Figura 29a, indicando que o óxido de ferro foi incorporado de maneira mais uniforme que a primeira condição. Com isso, comparando-se a Figura 28 e a Figura 29, pode-se concluir que a técnica de deposição de hematita por *spin coating* foi mais adequada, devido às estruturas menores e à maior homogeneidade na microestrutura.

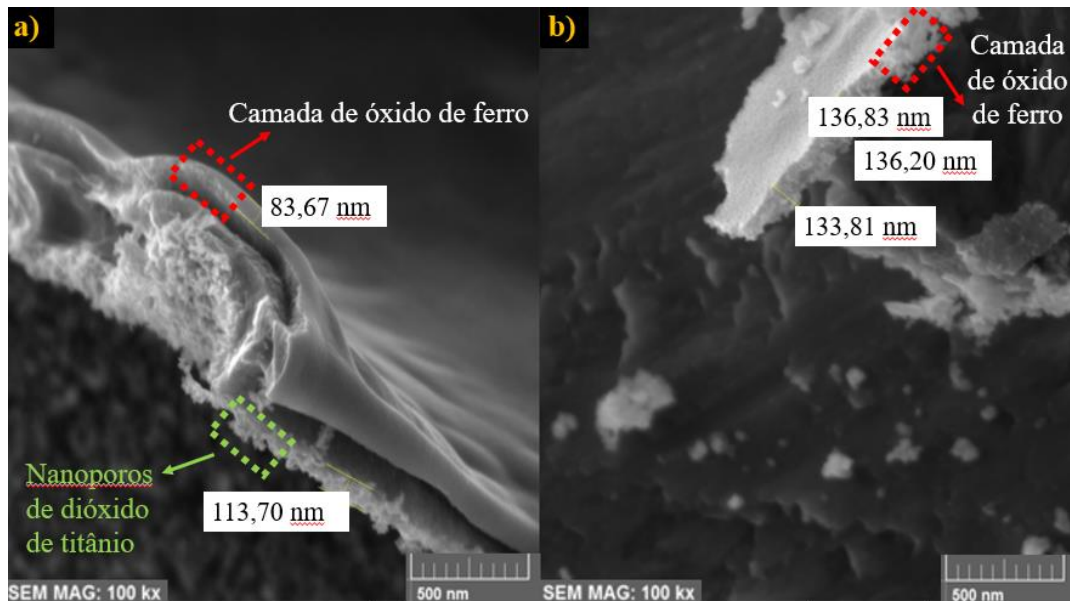
Considerando os resultados das micrografias acima, o restante da pesquisa foi realizado utilizando-se a técnica de incorporação de óxido de ferro por *spin coating*. Assim, as demais caracterizações foram realizadas em amostras da liga de Ti10Mo8Nb com incorporação de óxido de ferro (3 e 5 camadas) e em amostras da liga após funcionalização (APPA e MPA).

Figura 31 - Micrografias das amostras riscadas da liga experimental Ti10Mo8Nb anodizadas, com deposição de óxido de ferro pelo método de *spin coating*, sendo a) 3 camadas e b) 5 camadas. Vista de cima, ambas com magnificação de 80 kx.



Fonte: Autoria própria (2019).

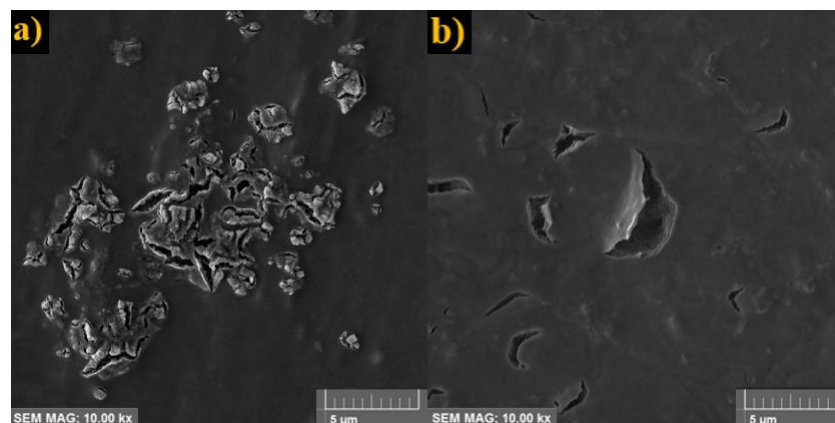
Figura 32 - Micrografias das amostras riscadas da liga experimental Ti10Mo8Nb anodizadas, com deposição de óxido de ferro pelo método de *spin coating*, sendo a) 3 camadas e b) 5 camadas. Vista transversal, ambas com magnificação de 100 kx.



Fonte: Autoria própria (2019).

As amostras das micrografias da Figura 30 e da Figura 31 foram riscadas, de maneira a perturbar as camadas e verificar a separação entre elas. A partir da Figura 30a e da Figura 30b, pode-se perceber que existem duas camadas, sendo uma nanoporosa (TiO_2) e uma lisa, indicando que o óxido de ferro foi incorporado na superfície. Por fim, na Figura 31a e na Figura 31b, a imagem transversal permite identificar e quantificar as camadas, sendo que para a primeira condição foi obtido $79,72 \text{ nm} \pm 3,95$ e para a segunda, $135,61 \text{ nm} \pm 1,80$ de espessura da camada de óxido de ferro.

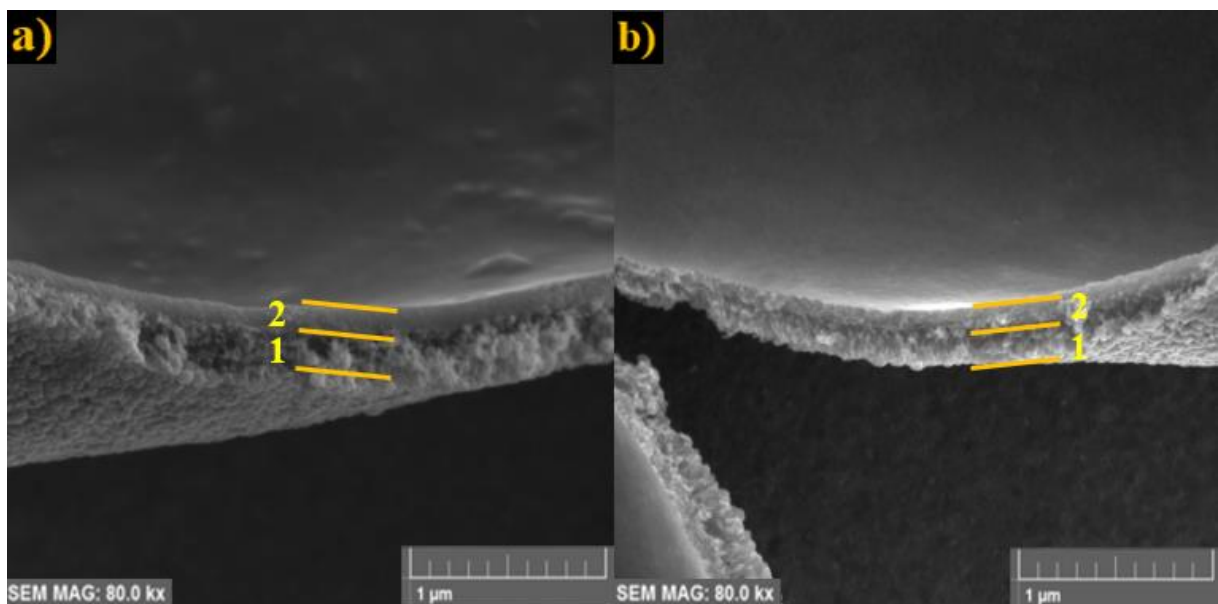
Figura 33 – Micrografias com exemplos de delaminações ao longo da superfície da amostra da liga Ti10Mo8Nb anodizada, depositada com óxido de ferro (3 camadas), funcionalizadas com a) APPA e b) MPA.



Fonte: Autoria própria (2019).

Pode-se observar as delaminações na Figura 32, essa característica aparece em toda a extensão das amostras com 3 camadas de deposição de óxido de ferro. A formação de micro trincas ocorre devido ao encolhimento de volume dos revestimentos e das tensões térmicas que surgem a partir da diferença no coeficiente de expansão térmica entre o Ti e o revestimento de óxido de ferro durante o resfriamento (ELSAKA et al., 2010; L. GUO, W. FENG, X. LIU, C. LIN, B. LI, 2015). Qualquer delaminação ou ruptura na superfície modificada pode iniciar um processo tóxico e conduzir à severas reações imuno-inflamatórias (LI et al., 2018), assim deu-se prosseguimento à pesquisa relacionada à 5 camadas de óxido de ferro incorporadas na superfície da liga TMN.

Figura 34 – Micrografias da liga TMN anodizada após deposição de óxido de ferro por *spin coating*, 5 camadas, funcionalizadas com a) APPA e b) MPA, sendo 1) camada de nanoporos de TiO₂, 2) camada de óxido de ferro e 3) camada com polímero funcionalizado.



Fonte: Autoria própria (2019).

As micrografias das amostras com 5 camadas de hematita por meio do método *spin coating*, são semelhantes após a funcionalização com as camadas de APPA e de MPA. A partir da Figura 33 observa-se a camada inferior com os nanoporos (anodização, TiO₂) e a camada superior (deposição de óxido de ferro).

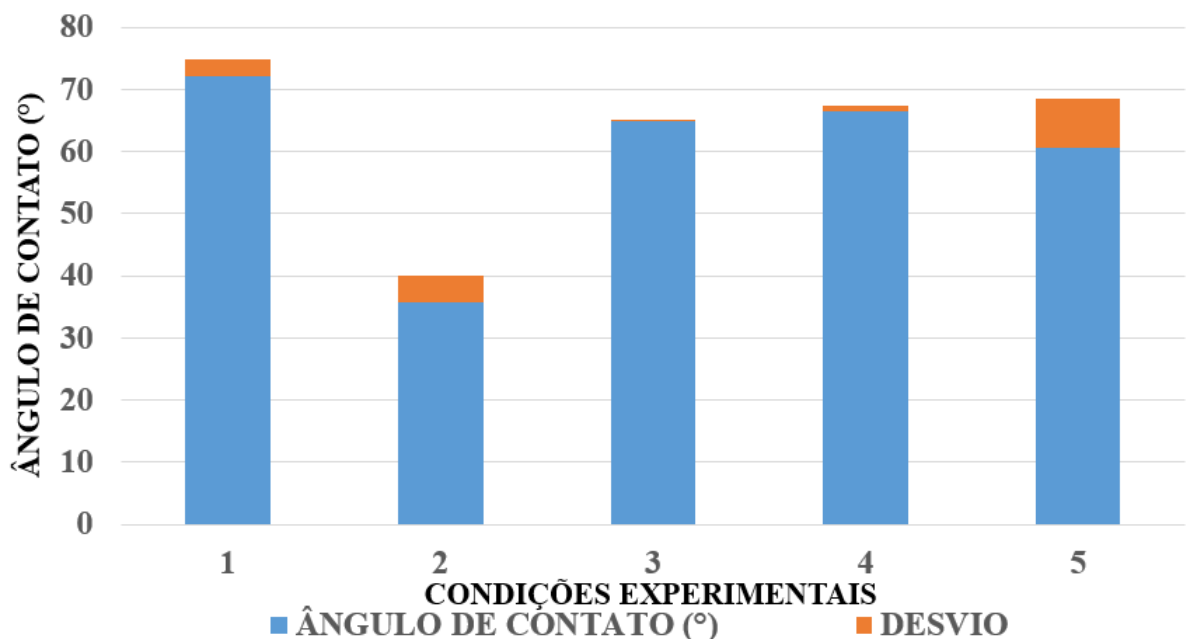
5.4.3 Análise do ângulo de contato (molhabilidade)

O ângulo de contato é um indicativo do espalhamento de um fluido sobre uma superfície e quanto menor esse valor, maior é caráter hidrofílico da superfície. A análise da molhabilidade por meio da medida do ângulo de contato pode ser influenciada pela heterogeneidade topográfica da superfície, além de medir apenas um tipo de interação, polar ou apolar (CAROBOLANTE, 2017). A molhabilidade da superfície é um dos parâmetros mais importantes que afetam a resposta biológica em um biomaterial implantado. Ela afeta adsorção de proteína, coagulação sanguínea, adesão celular e de bactéria (ESCADA; NAKAZATO; CLARO, 2017).

Na Figura 34 pode-se observar o ângulo de contato considerando o sistema gasoso-líquido-sólido como ar, água destilada e superfície da amostra. Foram analisadas as amostras:

- a) Liga TMN lixada até granulação 1200;
- b) Liga TMN anodizada e calcinada;
- c) Liga TMN anodizada, com 5 camadas de óxido de ferro;
- d) Liga TMN anodizada, com 5 camadas de óxido de ferro, funcionalizada com APPA;
- e) Liga TMN anodizada, com 5 camadas de óxido de ferro, funcionalizada com MPA.

Figura 35 – Resultados obtidos na análise do ângulo de contato, por meio do método de gota séssil, considerando os meio ar, água destilada e superfície da liga Ti10Mo8Nb. 1) TMN lixada, 2) TMN + calcinada 3) TMN + óxido de ferro, 4) TMN + APPA e 5) TMN + MPA.



Pode-se observar que todos os ângulos de contato apresentam caráter hidrofílico ($<90^\circ$), sendo que a liga calcinada é mais hidrofílica em relação às demais condições e as opções com óxido de ferro seguem um mesmo caráter hidrofílico, com ângulo de aproximadamente 64° . O ângulo de contato da superfície de um implante é importante na bioatividade e na adesão celular, sendo que sua diminuição é mais favorável a estas propriedades (AGILAN; RAJENDRAN, 2018). Além disso, a hidroflicidade do material induz o contato com os fluidos corpóreos, que resulta em desenvolvimento celular (RUPP et al., 2006). Assim, segundo Escada et al. (2017), superfícies altamente hidrofílicas são mais desejáveis que as hidrofóbicas devido às suas interações com fluidos biológicos, células e tecidos. Por isso, para promover proliferação de osteoblastos humanos, é necessário aumentar a área de superfície do implante, que conseqüentemente aumenta a molhabilidade da superfície.

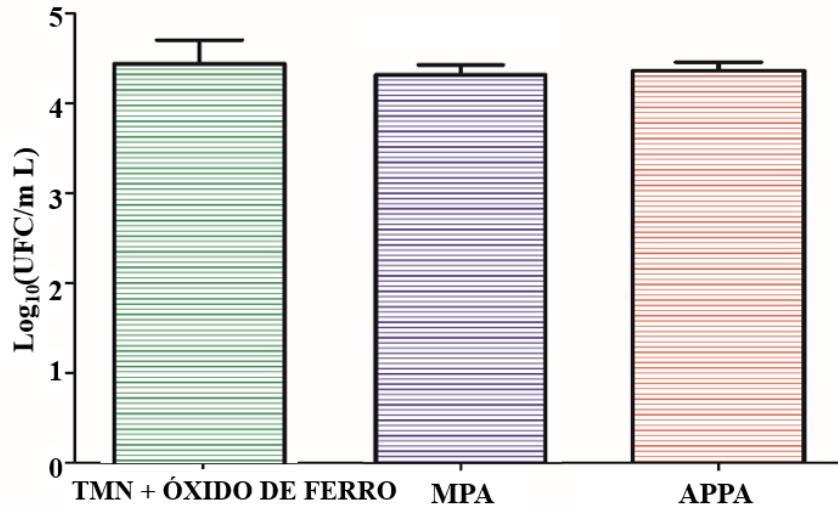
5.5 ANÁLISE DA ADESÃO DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA

5.5.1 Ensaio de adesão

A partir da análise dos dados de $\text{Log}_{10}(\text{UFC/mL})$ (Figura 35) e XTT (Figura 36) foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (liga Ti10Mo8Nb anodizada com 5 camadas de óxido de ferro por *spin coating*, liga Ti10Mo8Nb após funcionalização com MPA e liga Ti10Mo8Nb após funcionalização com APPA; $p>0,05$).

A Figura 35 permite identificar a probabilidade de formar colônia de células de bactérias na superfície da amostra e com os resultados pode-se observar que os valores estatísticos são semelhantes entre os grupos analisados, no qual apresentam em média 4,3 UFC/mL de solução.

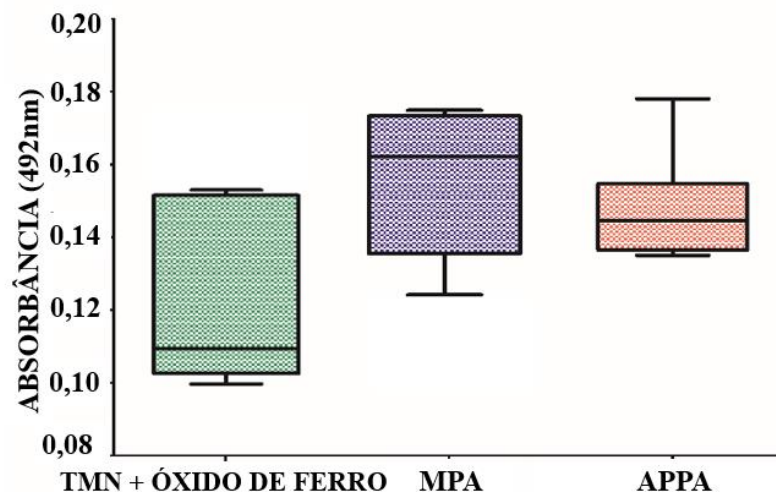
Figura 36 - Valores médios de $\text{Log}_{10}(\text{UFC}/\text{mL})$ de *Escherichia coli* aderida aos espécimes de titânio com tratamento de superfície (TMN + óxido de ferro) e com funcionalização (MPA, APPA). As barras de erro indicam o desvio padrão ($n=9$).



Fonte: Autoria própria (2019).

Nos resultados obtidos no ensaio de XTT (Figura 36), é analisada a atividade metabólica das células bacterianas. A partir do gráfico obtido pode-se observar que o primeiro grupo (TMN + óxido de ferro) apresenta menores valores de atividade metabólica, que é mais favorável (CRISTINA; NARDELLO, 2018), porém, de maneira geral os valores são semelhantes, variando entre 0,11 e 0,16.

Figura 37 - Valores absorvância (492nm) do ensaio de XTT das células de *E. coli* aderidas nas superfícies de titânio. Linha interna: mediana; Limite superior da caixa: 3° quartil; Limite inferior da caixa: 1° quartil; Barras de erro: valores mínimo e máximo ($n=6$).

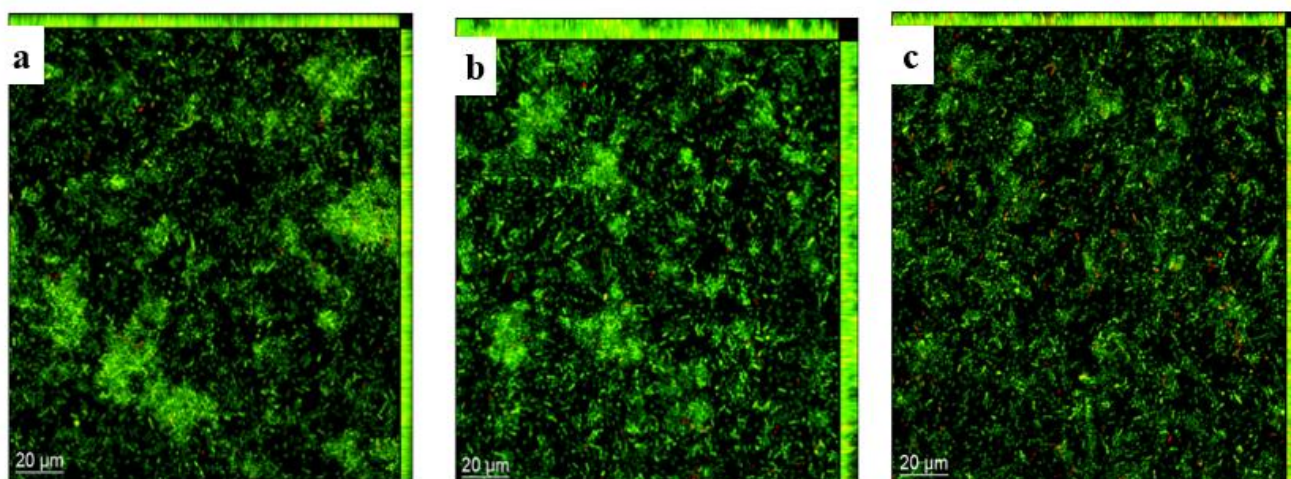


Fonte: Autoria própria (2019).

5.5.2 Microscopia de fluorescência confocal a laser

Ao analisar as imagens de microscopia de fluorescência confocal a laser (Figura 37), é possível observar espalhamento semelhante das células nas três superfícies avaliadas. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos no que diz respeito ao número de colônias viáveis, metabolismo e espessura da adesão, nota-se um menor número de micro colônias na superfície referente ao tratamento de funcionalização com o polímero APPA (Figura 37c), enquanto o comportamento das células aderidas à superfície da liga funcionalizada com MPA (Figura 37b) foi semelhante ao comportamento das células aderidas ao grupo da liga anodizada com as 5 camadas de óxido de ferro (Figura 37a).

Figura 38 – Micrografias células *E. coli* aderidas nas superfícies. Marcação realizada com iodeto de propídio (células em vermelho) e Syto9 (células em verde): a) Liga TMN + óxido de ferro, b) Liga funcionalizada - MPA, c) Liga funcionalizada - APPA. Magnificação 40x.



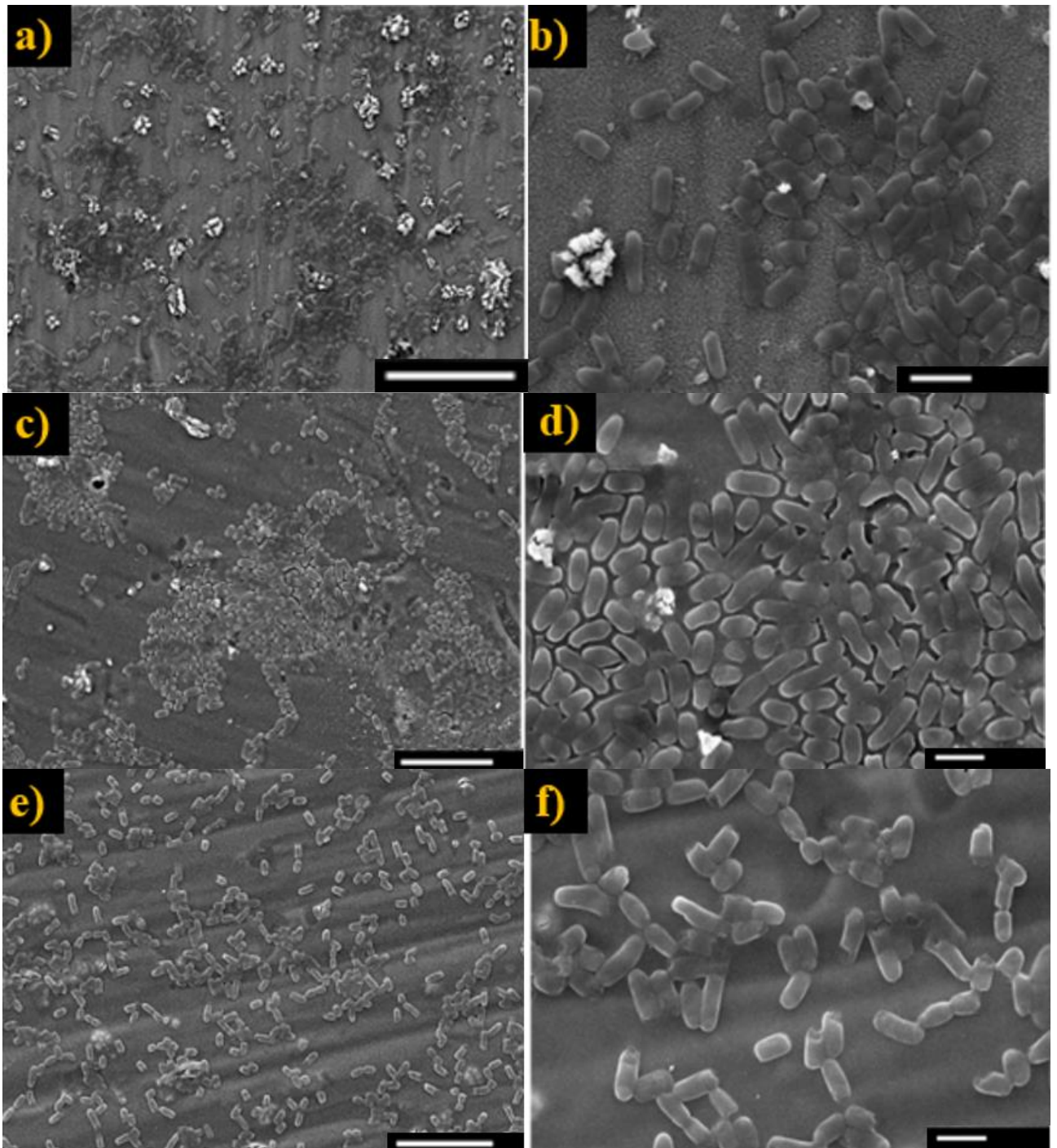
Fonte: Autoria própria (2019).

5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

Ao analisar as imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 38) foi possível notar integridade das células de *E. coli* em todos os grupos analisados. Contudo, nota-se menor aglomeração de células nos grupos com superfície tratada (TMN + Hematita – Figura 38a e Figura 38b) e funcionalizada com APPA (Figura 38e e Figura 38f) quando comparadas ao grupo com superfície funcionalizada com MPA (Figura 38c e Figura 38d), semelhante ao que foi observado na microscopia de fluorescência confocal a laser.

A aglutinação das células bacterianas pode indicar que estas estão iniciando um mecanismo de defesa contra a superfície da amostra. Desta forma, se a análise fosse realizada em maior tempo, poderia haver diminuição na atividade metabólica das células da bactéria e posteriormente morte das mesmas (DE OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 39 - Micrografias células de *E. coli* aderidas nas superfícies: a) e b) Liga TMN + óxido de ferro, c) e d) Liga funcionalizada com MPA, e) e f) Liga funcionalizada com APPA. Magnificação 2 kx (a, c e e); 6 kx (b, d e f).



Fonte: Autoria própria (2019).

6 CONCLUSÃO

A partir dos objetivos propostos neste trabalho, pode-se afirmar que houve reprodutibilidade no processamento e obtenção da liga experimental Ti10Mo8Nb, assim como na formação de estrutura nanoporosa após a anodização da superfície da liga, com diâmetro interno dos nanoporos a aproximadamente 24 nm. Este resultado é adequado porque superfícies porosas induzem a osseointegração e a melhoram a bioatividade do implante.

A superfície anodizada da liga é muito mais hidrofílica do que a superfície não anodizada, sendo melhor para a incorporação de hematita. Após os tratamentos de modificação da superfície, pode-se concluir que em todas as condições os ângulos de contato apresentam caráter hidrofílico ($<90^\circ$), característica favorável à bioatividade do material e para a adesão celular.

Ao analisar as condições do pó cerâmico, a temperatura de cristalização das nanopartículas de óxido de ferro no qual se gera a fase pura de hematita foi 600°C . Nesta temperatura, se formaram nanopartículas homogêneas sendo a condição mais adequada para a deposição na superfície das amostras, em relação aos tratamentos térmico a 500° e a 550°C .

A partir dos resultados obtidos na espectroscopia Raman, existem bandas características das ligações Fe-O e O-Ti-O, indicando a possibilidade de deposição de Fe_2O_3 na superfície da liga TMN e a formação da camada de TiO_2 na superfície da liga Ti10Mo8Nb.

A técnica de incorporação por *spin coating* foi mais adequada quando comparada à técnica de imersão, devido à homogeneidade na superfície das amostras. Ao comparar-se incorporação de óxido de ferro por *spin coating* com 3 e 5 camadas, pode-se concluir que a segunda condição é mais adequada pois na primeira ocorreu delaminação em toda a superfície da amostra.

A análise de adesão bacteriana não apresentou diferença significativa entre os grupos no que diz respeito ao número de colônias viáveis, metabolismo e espessura da adesão, embora nota-se menor número de micro colônias e menor aglomeração de células na superfície funcionalizada com APPA, em relação aos demais grupos.

De maneira geral, pode-se concluir que houve deposição de óxido de ferro na superfície da liga Ti10Mo8Nb, porém, nas condições estudadas, a deposição não melhorou significativamente quanto à adesão de bactéria em relação à superfície da liga anodizada.

7 TRABALHOS FUTUROS

Diminuição do tamanho das nanopartículas de óxido de ferro em aproximadamente 10 nm, com o intuito de penetrar na parede da bactéria e destruí-la;

Incorporação de camadas de óxido de ferro na superfície anodizada, controlando as condições de processamento para que o filme formado seja poroso;

Caracterização completa das diferentes camadas usando as técnicas de difratometria de raios X com ângulo rasante e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS);

Análise de bactérias com maior tempo de cultura das células, verificando se o tempo de adesão é um fator relevante para a melhora da atividade bactericida.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAH, S. M.; FERESHTEH, F.; NAZANIN, F. Synthesis and modification of iron oxide nanoparticles (magnetite) for biomedical applications. **Research Journal of Biotechnology**, India, v. 12, n. 9, p. 87–95, 2017.
- ADAMCZYK, Z. *et al.* Mechanisms of nanoparticle and bioparticle deposition - kinetic aspects. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 439, p. 3–22, 2013.
- AGILAN, P.; RAJENDRAN, N. In-vitro bioactivity and electrochemical behavior of polyaniline encapsulated titania nanotube arrays for biomedical applications. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 439, p. 66–74, 2018.
- ALI, S. H. R.; ALMAATOQ, M. M. A.; MOHAMED, A. S. A. Recent progress in nanometrology techniques for object characterization. **International Journal of Engineering Research and Applications**, India, v. 3, n. 4, p. 1343–1366, 2013.
- ASSEFPOUR-DEZFULY, M.; VLACHOS, C.; ANDREWS, E. H. Oxide morphology and adhesive bonding on titanium surfaces. **Journal of Materials Science**, Norwell, v. 19, n. 11, p. 3626–3639, 1984.
- BATH, S. V. **Biomaterials**. India : Narosa Publishing House, 2002.
- BELL, A. The impact of nanoscience on heterogeneous. **Science**, Washington, v. 299, n. 5613, p. 1688–1691, 2003.
- BJURSTEN, L. M. *et al.* Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research - part A**, Hoboken, v. 92, n. 3, p. 1218–1224, 2010.
- BORA, M.; A. *et al.* Room temperature operating sensitive and reproducible ammonia sensor based on PANI/hematite nanocomposite. **Polymer-Plastics Technology and Materials**, New York, v. 58, n. 14, p. 1545–1555, 2019.
- BRUNETTE, D. M. *et al.* **Titanium in medicine**. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, London, v. 216, n. 3, p. 215–215, 2002.
- CAROBOLANTE, J. P. A. **Modificação da superfície da liga experimental Ti10Mo8Nb empregando oxidação anódica - estudos *in vitro***. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica - Materiais) - Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2017.
- CAROBOLANTE, J. P. A. *et al.* Cell and bacteria-bacterial interactions on the Ti10Mo8Nb alloy after surface modification. **Materials Research**, São Carlos, v. 21, n. 4, p. 3–7, 2018.

CESAR, I.; KAY, A.; MARTINEZ, J. A. G.; GRÄTZEL, M. Translucent thin film Fe₂O₃ photoanodes for efficient water splitting by sunlight: nanostructure-directing effect of Si-doping. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 128, n. 14, p. 4582–4583, 2006.

CHELARIU, R. *et al.* Metastable beta Ti-Nb-Mo alloys with improved corrosion resistance in saline solution. **Electrochimica Acta**, New York, v. 137, p. 280–289, 2014.

CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering R: reports**, Lausanne, v. 87, p. 1–57, 2015.

CHIRITA, M.; GROZESCU, I. Iron oxide nanoparticles and their photoelectrochemical and medical applications a short overview. **Analele Universității de Vest, seria Fizica**, București, v. 52, n. jan. 2008, p. 121-135, 2008.

CLARO, A. P. R. A. *et al.* Incorporation of silver nanoparticles on Ti7.5Mo alloy surface containing TiO₂ nanotubes arrays for promoting antibacterial coating – in vitro and in vivo study. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 455, n. dez. 2017, p. 780–788, 2018.

CRISTINA, L.; NARDELLO, L. **Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA.** 2018. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

DAVAR, F.; HADADZADEH, H.; ALAEDINI, T. S. Single-phase hematite nanoparticles: non-alkoxide sol-gel based preparation, modification and characterization. **Ceramics International**, Oxford, v. 42, n. 16, p. 19336–19342, 2016.

EDMISTON JÚNIOR, C. E. *et al.* Impact of selective antimicrobial agents on *Staphylococcal* adherence to biomedical devices. **American Journal of Surgery**, New York, v. 192, n. 3, p. 344–354, 2006.

ELSAKA, S. E. *et al.* Effect of chromium interlayer on the shear bond strength between porcelain and pure titanium. **Dental Materials**, Kidlington, v. 26, n. 8, p. 793–798, 2010.

ELSANOUSI, A. *et al.* Self-organized TiO₂ nanotubes with controlled dimensions by anodic oxidation. **Journal of Materials Science**, Norwell, v. 43, n. 22, p. 7219–7224, 2008.

ESCADA, A. L.; NAKAZATO, R. Z.; CLARO, A. P. R. A. Influence of anodization parameters in the TiO₂ nanotubes formation on Ti-7.5Mo alloy surface for biomedical application. **Materials Research**, São Carlos, v. 20, n. 5, p. 1282–1290, 2017.

FADL-ALLAH, S. A.; QUAHTANY, M.; EL-SHENAWY, N. S. Surface modification of titanium plate with anodic oxidation and its application in bone growth. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, United States, v. 04, n. 01, p. 74–83, 2013.

FADLALLA, H. M. H. *et al.* Synthesis and characterization of single crystalline YAG:Eu nano-sized powder by sol-gel method. **Materials Chemistry and Physics**, Lausanne, v. 109, n. 2–3, p. 436–439, 2008.

FEARS, T. R.; TARONE, R. E. False-positive and false-negative rates for carcinogenicity screens. **Cancer Research**, Baltimore, v. 37, p. 1941–1945, 1977.

FELDMANN, C. Preparation of nanoscale pigment particles. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 13, n. 17, p. 1301–1303, 2001.

GAO, F.; TEPLYAKOV, A. V. Challenges and opportunities in chemical functionalization of semiconductor surfaces. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 399, p. 375–386, 2017.

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

GHAVAMINEJAD, A. *et al.* Immobilization of silver nanoparticles on electropolymerized polydopamine films for metal implant applications. **Colloids and Interface Science Communications**, Amsterdam, p. 5–8, 2015.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, Surrey, v. 26, n. 18, p. 3995–4021, 2005.

HARING, A.; MORRIS, A.; HU, M.. Controlling morphological parameters of anodized titania nanotubes for optimized solar energy applications. **Materials**, Switzerland, v. 5, n. 10, p. 1890–1909, 2012.

HASAN, J.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 295–304, 2013.

HATAMLEH, M. M. *et al.* Surface characteristics and biocompatibility of cranioplasty titanium implants following different surface treatments. **Dental Materials**, Kidlington, v. 34, n. 4, p. 676–683, 2018.

HUYNH, E.; ZHENG, G.. Engineering multifunctional nanoparticles: All-in-one versus one-for-all. **Wiley Interdisciplinary Reviews: nanomedicine and nanobiotechnology**, United States, v. 5, n. 3, p. 250–265, 2013.

INDIRA, K. *et al.* Effect of anodization parameters on the structural morphology of titanium in fluoride containing electrolytes. **Materials Characterization**, New York, v. 71, n. fev. 2018, p. 58–65, 2012.

INDIRA, K. *et al.* A review on TiO₂ nanotubes: influence of anodization parameters, formation mechanism, properties, corrosion behavior, and biomedical applications. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, Switzerland, v. 1, n. 4, p. 1–22, 2015.

INDIRA, K.; KAMACHI MUDALI, U.; RAJENDRAN, N. Development of self-assembled titania nanopore arrays for orthopedic applications. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, Switzerland, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2017.

FOJT, J.; FILIP, V.; JOSKA, L. On the increasing of adhesive strength of nanotube layers on beta titanium alloys for medical applications. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 355, p. 52–58, 2015.

JIANG, P.; MCFARLAND, M. J. Large-scale fabrication of wafer-size colloidal crystals, macroporous polymers and nanocomposites by spin-coating. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 126, n. 42, p. 13778–13786, 2004.

JIN, M.; LU, X.; QIAO, Y.; WANG, L. N.; VOLINSKY, A. A. Fabrication and characterization of anodic oxide nanotubes on TiNb alloys. **Rare Metals**, China, v. 35, n. 2, p. 140–148, 2016.

JIRKA, I. *et al.* On the role of Nb-related sites of an oxidized β -TiNb alloy surface in its interaction with osteoblast-like MG-63 cells. **Materials Science and Engineering C**, Lausanne, v. 33, n. 3, p. 1636–1645, 2013.

JOYA, M. R.; BARÓN-JAIMEZ, J.; BARBA-ORTEGA, J. Preparation and characterization of Fe₂O₃ nanoparticles. **Journal of Physics: conference series**, Bristol, v. 466, n. 1, p. 2004–2009, 2013.

KHALIL, H. *et al.* Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 4, p. 460–465, 2007.

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

KIRMANIDOU, Y. *et al.* New Ti-alloys and surface modifications to improve the mechanical properties and the biological response to orthopedic and dental implants: a review. **BioMed Research International**, London, v. 2016, n. 2, p. 1–21, 2016.

KO, Y. G. *et al.* Fabrication of colloidal crystals on hydrophilic/hydrophobic surface by spin-coating. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v. 385, n. 1–3, p. 188–194, 2011.

KRAMER, E. R. *et al.* Synthesis and characterization of iron-substituted hydroxyapatite via a simple ion-exchange procedure. **Journal of Materials Science**, Norwell, v. 48, n. 2, p. 665–673, 2013.

KULKARNI, M. *et al.* Influence of anodization parameters on morphology of TiO₂ nanostructured surfaces. **Advanced Materials Letters**, India, v. 7, n. 1, p. 23–28, 2016.

KUMAR, N. *et al.* TiO₂ and its composites as promising biomaterials: a review. **BioMetals**, London, v. 31, n. 2, p. 147–159, 2018.

GUO, L. *et al.* Sol-gel synthesis of antibacterial hybrid coatings on titanium. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 160, p. 448–451, 2015.

LEWIS, C. S. *et al.* Absence of cytotoxicity towards microglia of iron oxide (α -Fe₂O₃) nanorhombhedra. **Toxicology Research**, United Kingdom, v. 5, n. 3, p. 836–847, 2016.

LI, H. *et al.* Antibacterial activity of TiO₂ nanotubes: influence of crystal phase, morphology and Ag deposition. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 284, p. 179–183, 2013.

- LI, T. *et al.* Understanding and augmenting the stability of therapeutic nanotubes on anodized titanium implants. **Materials Science and Engineering C**, Lausanne, v. 88, n. out. 2017, p. 182–195, 2018.
- LIU, X. Q.; TAO, S. W.; SHEN, Y. S. Preparation and characterization of nanocrystalline α -Fe₂O₃ by a sol-gel process. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 40, n. 2–3, p. 161–165, 1997.
- LU, J. F.; TSAI, C. J. Hydrothermal phase transformation of hematite to magnetite. **Nanoscale Research Letters**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2014.
- LUNIN, A. V. *et al.* Synthesis of highly-specific stable nanocrystalline goethite-like hydrous ferric oxide nanoparticles for biomedical applications by simple precipitation method. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 541, p. 143–149, 2019.
- MAHMOUDI, M. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 63, n. 1–2, p. 24–46, 2011.
- MARINUCCI, L. *et al.* Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Illinois, v. 21, n. 5, p. 719–725, 2006.
- MARTINS JÚNIOR, J. R. S. *et al.* Preparation and characterization of Ti-15Mo alloy used as biomaterial. **Materials Research**, São Carlos, v. 14, n. 1, p. 107–112, 2011.
- MÉNDEZ, M. *et al.* Sol-gel Pechini synthesis and optical spectroscopy of nanocrystalline La₂O₃ doped with Eu³⁺. **Optical Materials**, Poland, v. 32, n. 12, p. 1686–1692, 2010.
- MINAGAR, S. *et al.* A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. **Acta Biomaterialia**, France, v. 8, n. 8, p. 2875–2888, 2012.
- MINAGAR, S. *et al.* Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, Hoboken, v. 101 A, n. 9, p. 2726–2739, 2013.
- MIRZAEI, A. *et al.* Highly stable and selective ethanol sensor based on α -Fe₂O₃ nanoparticles prepared by Pechini sol-gel method. **Ceramics International**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 6136–6144, 2016.
- MOHAN, L. *et al.* Electrophoretic deposition of nanocomposite (HAp + TiO₂) on titanium alloy for biomedical applications. **Ceramics International**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 3435–3443, 2012.
- MOHAPATRA, S. K.; BANERJEE, S.; MISRA, M. Synthesis of Fe₂O₃/TiO₂ nanorod-nanotube arrays by filling TiO₂ nanotubes with Fe. **Nanotechnology**, Bristol, v. 19, n. 31, p. 1–8, 2008.

MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.

NEACSU, P. *et al.* *In vitro* performance assessment of new beta Ti-Mo-Nb alloy compositions. **Materials Science and Engineering C**, Lausanne, v. 47, p. 105–113, 2015.

OLIVEIRA, J. A. G. *et al.* Analysis of the effects of irradiation in osseointegrated dental implants. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 23, n. 4, p. 511–514, 2012.

OLIVEIRA, R. C. *et al.* Mechanism of antibacterial activity via morphology change of α -AgVO₃: theoretical and experimental insights. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Washington, v. 9, n. 13, p. 11472–11481, 2017.

OLMEDO, D. G. *et al.* Local effect of titanium implant corrosion: an experimental study in rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 37, n. 11, p. 1032–1038, 2008.

ORTEGA, P. *et al.* Synthesis, structure and magnetic properties of Y₃Fe_{5-x}Al_xO₁₂ garnets prepared by the soft chemical method. **Processing and Application of Ceramics**, Serbia, v. 8, n. 4, p. 211–218, 2014.

PAILHÉ, N. *et al.* Correlation between structural features and vis-NIR spectra of α -Fe₂O₃ hematite and AFe₂O₄ spinel oxides (A=Mg, Zn). **Journal of Solid State Chemistry**, San Diego, v. 181, n. 5, p. 1040–1047, 2008.

PECHINI, M. P.; ADAMS, N. **Method of preparing lead and alkaline Earth titanates and niobates and coating method using the same to form a capacitor**. Depositante: Maggio P. Pechini. Procurador: Connolly and Hutz. 3,330,697. Depósito: 26 ago. 1963. Concessão: 11 jul. 1967.

PEIGHAMBARDOUST, N. S.; NASIRPOURI, F. Manipulating morphology, pore geometry and ordering degree of TiO₂ nanotube arrays by anodic oxidation. **Surface and Coatings Technology**, Lausanne, v. 235, n. set., p. 727–734, 2013.

PUJARI, S. P. *et al.*; Covalent surface modification of oxide surfaces. **Angewandte Chemie - international edition**, Weinheim, v. 53, n. 25, p. 6322–6356, 2014.

RAJENDRAN, K. *et al.* Evaluation of cytotoxicity of hematite nanoparticles in bacteria and human cell lines. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Amsterdam, v. 157, p. 101–109, 2017.

RAMESH, R. *et al.* Synthesis and vibrational properties of hematite (α -Fe₂O₃) nanoparticles. **Journal of Materials Science: materials in electronics**, London, v. 22, n. 9, p. 1357–1360, 2011.

RAO, X.; CHU, C. L.; ZHENG, Y. Y. Phase composition, microstructure, and mechanical properties of porous Ti-Nb-Zr alloys prepared by a two-step foaming powder metallurgy method. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 34, p. 27–36, 2014.

REGONINI, D. *et al.* A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. **Materials Science and Engineering: R: reports**, Lausanne, v. 74, n. 12, p. 377–406, 2013.

REHMAN, S. *et al.* Facile synthesis of anisotropic single crystalline alpha-Fe₂O₃ nanoplates and their facet-dependent catalytic performance. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, Pakistan, v. 12, n. 22, p. 6397–6406, 2017.

RIBEIRO, P. C. *et al.* TiO₂ sintetizado pelo método Pechini: caracterização estrutural e morfológica. In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA (CONEM), 6., 2010, Campina Grande. **Anais [...]**. Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2010.

RIES, A. *et al.* Barium strontium titanate powder obtained by polymeric precursor method. **Materials Characterization**, New York, v. 50, p. 217–221, 2003.

ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: synthesis and applications. **Angewandte Chemie - international edition**, Weinheim, v. 50, n. 13, p. 2904–2939, 2011.

RUFUS, A.; SREEJU, N.; PHILIP, D. Size tunable biosynthesis and luminescence quenching of nanostructured hematite (α -Fe₂O₃) for catalytic degradation of organic pollutants. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, New York, v. 124, n. jul. 2018, p. 221–234, 2019.

RUPP, F. *et al.* Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research - part A**, Hoboken, v. 76, n. 2, p. 323–334, 2006.

SADOWSKA, M.; ADAMCZYK, Z.; NATTICH-RAK, M. Formation of hematite nanoparticle monolayers of controlled coverage and structure at polymeric microparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 505, p. 509–518, 2017.

SIMÕES, A. Z. *et al.* Retention characteristics in Bi_{3.25}La_{0.75}Ti₃O₁₂ thin films prepared by the polymeric precursor method. **Applied Physics Letters**, New York, v. 86, n. 11, p. 1–3, 2005.

SPRIANO, S. *et al.* A critical review of multifunctional titanium surfaces: new frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. **Acta Biomaterialia**, France, v. 79, p. 1–22, 2018.

STOIMENOV, P. K. *et al.* Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. **Langmuir**, Washington, v. 18, n. 17, p. 6679–6686, 2002.

SUBBIAHDOSS, G. *et al.* Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant *Staphylococci*. **Acta Biomaterialia**, France, v. 8, n. 6, p. 2047–2055, 2012.

TAN, A. W. *et al.* Review of titania nanotubes: fabrication and cellular response. **Ceramics International**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 4421–4435, 2012.

TRINO, L. D. *et al.* Surface physicochemical and structural analysis of functionalized titanium dioxide films. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v. 546, n. mar., p. 168–178, 2018.

VERISSIMO, N. C. *et al.* *In situ* characterization of the effects of Nb and Sn on the anatase-rutile transition in TiO₂ nanotubes using high-temperature X-ray diffraction. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 307, p. 372–381, 2014.

WANG, Q.; XU, S.; SHEN, F. Preparation and characterization of TiO₂ photocatalysts co-doped with iron (III) and lanthanum for the degradation of organic pollutants. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 257, n. 17, p. 7671–7677, 2011.

WANG, T. *et al.* Controlled release and biocompatibility of polymer/titania nanotube array system on titanium implants. **Bioactive Materials**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 44–50, 2017.

WANG, Y. B.; ZHENG, Y. F. Corrosion behaviour and biocompatibility evaluation of low modulus Ti-16Nb shape memory alloy as potential biomaterial. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 63, n. 15, p. 1293–1295, 2009.

WEBER, J. N.; WHITE, E. W. Carbon-metal graded composites for permanent osseous attachment of non-porous metals. **Materials Research Bulletin**, New York, v. 7, n. 9, p. 1005–1016, 1972.

WEBSTER, T. J.; EJIOFOR, J. U. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. **Biomaterials**, Surrey, v. 25, n. 19, p. 4731–4739, 2004.

WHEELER, D. A. *et al.* Nanostructured hematite: synthesis, characterization, charge carrier dynamics, and photoelectrochemical properties. **Energy and Environmental Science**, London, v. 5, n. 5, p. 6682–6702, 2012.

WU, Y.; WANG, X. Preparation and characterization of single-phase α -Fe₂O₃ nano-powders by Pechini sol-gel method. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 65, n. 13, p. 2062–2065, 2011.

XU, J. *et al.* Potential use of porous titanium-niobium alloy in orthopedic implants: preparation and experimental study of its biocompatibility in vitro. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1–13, 2013.

YANG, Z. *et al.* Mechanism and kinetics of apatite formation on nanocrystalline TiO₂ coatings: a quartz crystal microbalance study. **Acta Biomaterialia**, France, v. 4, n. 3, p. 560–568, 2008.

YILMAZ, E. *et al.* Mechanical properties and electrochemical behavior of porous Ti-Nb biomaterials. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 87, n. jul., p. 59–67, 2018.

ZHONG, S. *et al.* Effects of polydopamine functionalized titanium dioxide nanotubes on endothelial cell and smooth muscle cell. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Amsterdam, v. 116, p. 553–560, 2014.

ZHU, C. L. *et al.* Fe₂O₃/TiO₂ tube-like nanostructures: synthesis, structural transformation and the enhanced sensing properties. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Washington, v. 4, n. 2, p. 665–671, 2012.

ZWILLING, V. *et al.* Structure and physicochemistry of anodic oxide\films on titanium and Ta6V alloy. **Surface Interface Analysis**, London, v. 27, n. jan., p. 629–637, 1999.

APÊNDICE A - Cálculos utilizados para pesagem dos reagentes utilizados no método dos precursores poliméricos (método Pechini)

Considerando as massas molares indicadas na Tabela 5, os cálculos utilizados para a obtenção de 2g de hematita foram:

$$\begin{array}{rcl} 2 \text{ mol Fe}_2\text{O}_3 & \text{-----} & 2 \text{ mol Fe} \\ 159,70\text{g Fe}_2\text{O}_3 & \text{-----} & 2 \times 55,85\text{g Fe} \\ 2\text{g} & \text{-----} & \text{massa de Fe} \end{array}$$

$$\text{Massa de Fe} = 1,3989\text{g}$$

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol Fe} & \text{-----} & 55,85\text{g} \\ \text{quantidade em mol de Fe} & \text{-----} & 1,3989\text{g} \end{array}$$

$$\text{Quantidade em mol de Fe} = 0,0250 \text{ mol}$$

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7 & \text{-----} & 1 \text{ mol Fe} \\ 265,03\text{g} & \text{-----} & 55,85\text{g} \\ \text{massa C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7 & \text{-----} & 1,3989\text{g Fe} \end{array}$$

$$\text{Massa C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7 = 6,6383\text{g}$$

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol Fe} & \text{-----} & 4 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \\ 0,0250 \text{ mol} & \text{-----} & \text{quantidade em mol de C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \end{array}$$

$$\text{Quantidade em mol de C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = 0,1 \text{ mol}$$

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7 & \text{-----} & 192,14\text{g} \\ 0,1 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7 & \text{-----} & \text{massa de C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \end{array}$$

$$\text{Massa de C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = 19,2140\text{g}$$

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol Fe} & \text{-----} & 16 \text{ mol C}_2\text{H}_6\text{O}_2 \\ 0,0250 \text{ mol} & \text{-----} & \text{quantidade em mol de C}_2\text{H}_6\text{O}_2 \end{array}$$

$$\text{Quantidade em mol de C}_2\text{H}_6\text{O}_2 = 0,4 \text{ mol}$$

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol C}_2\text{H}_6\text{O}_2 & \text{-----} & 62,08\text{g} \\ 0,4 \text{ mol C}_2\text{H}_6\text{O}_2 & \text{-----} & \text{massa de C}_2\text{H}_6\text{O}_2 \end{array}$$

$$\text{Massa de C}_2\text{H}_6\text{O}_2 = 24,8320\text{g}$$

Tabela 5 - Massas molares dos reagentes do método dos precursores poliméricos.

Átomos	Massa Atômica (g/mol)
Fe	55,85
O	16,00
C	12,01
H	1,01
N	14,01
Moléculas	Massa Molecular (g/mol)
Hematita (Fe ₂ O ₃)	159,70
Citrato de Amônio e Ferro III (C ₆ H ₁₁ FeNO ₇)	265,03
Ácido Cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	192,14
Etilenoglicol (C ₂ H ₆ O ₂)	62,08

Fonte: Autoria própria (2019).