unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE GUARATINGUETÁ

LILIANE LELIS DE OLIVEIRA

INCORPORAÇÃO DA CLOREXIDINA NA SUPERFÍCIE DA LIGA DE Ti-7,5Mo APÓS O CRESCIMENTO DE NANOTUBOS DE TiO_2

Guaratinguetá
2016

LILIANE LELIS DE OLIVEIRA

INCORPORAÇÃO DA CLOREXIDINA NA SUPERFÍCIE DA LIGA DE Ti-7,5Mo APÓS O CRESCIMENTO DE NANOTUBOS DE TiO_2

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

Orientadora: Prof. Dr. Ana Paula Rosifini Alves Claro

Co-orientadora: Ana Lúcia do Amaral Escada

Guatatinguetá
2016

Oliveira, Liliane Lelis de
O48i Incorporação da clorexidina na superfície da liga de Ti-7,5Mo após o crescimento de nanotubos de TiO2 / Liliane Lelis de Oliveira. – Guaratinguetá, 2016.
74 f : il.

Bibliografia: f. 68-74

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2016.

Orientador: Profª. Drª. Ana Paula Rosifini Alves Claro
Coorientador: Profª. Drª. Ana Lúcia do Amaral Escada

1. Materiais biomédicos 2. Ligas de titânio 3. Nanotubos 4. Clorexidina I. Título

CDU 620.1(043)

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE GUARATINGUETÁ

LILIANE LELIS DE OLIVEIRA

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

PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA: MATERIAIS

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. José Antonio Perrella Balestieri
Coordenador

B A N C A E X A M I N A D O R A:

Profa. Dra. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO
UNESP/FEG

Prof. Dr. ROBERTO ZENHEI NAKAZATO
UNESP/FEG

Prof. Dr. RODNEI BERTAZZOLI
UNICAMP

Julho de 2016

DADOS CURRICULARES

LILIANE LELIS DE OLIVEIRA

NASCIMENTO	28.04.1982 – GUARATINGUETÁ / SP
FILIAÇÃO	PAULO LELIS DE OLIVEIRA NILSA MARIA SILVA DE OLIVEIRA
2002/2005	Curso de Graduação em Licenciatura em Matemática Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista/UNESP
2009/2013	Curso de Graduação em Engenharia de MateriaisFaculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista/UNESP

À minha família, que com todo o carinho e apoio
fizeram-se co-autores deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Paulo Lelis que sempre acreditou em meu potencial e crescimento intelectual;

À minha mãe, Nilsa por preparar o melhor almoço do mundo todos os dias dessa jornada;

Aos meus irmãos favoritos Juliane e Paulinho;

À minha orientadora Professora Doutora Ana Paula Rosifini Alves Claro pelo incentivo e direcionamento no andamento desta pesquisa;

À banca: Professor Roberto Zenhei Nakazatoda UNESP- Campus de Guaratinguetá e Professor Doutor Rodney Bertazzoli da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp pela avaliação deste trabalho.

Agradecimentos especiais pela contribuição com as análises e resultados desta presente pesquisa:
Professor e Doutor Luis Rogério de Oliveira Hein - UNESP/FEG
Professor e Doutror Ronaldo Spezia Nunes - UNESP/FEG
Professora e Doutora Leide Lili Gonçalves da Silva Kostov – FATEC/Pinda
Professor e Doutor André da Silva Antunes - ITA
Cristiane Aparecida Pereira Correia – UNESP/São José dos Campos
Elizabeth Somessari e Carlos Silveira – IPEN/CTR

À todos do grupo de pesquisa de Biomateriais da UNESP-FEG, em especial, à minha co-orientadora Ana Lucia do Amaral Escada.

Ao meu querido amigo Felipe da Silva Barros pelo companheirismo inestimável.

OLIVEIRA, L. L. **Incorporação de Clorexidina na Superfície da liga Ti-7,5Mo após o crescimento de Nanotubos de TiO_2**.2016. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Guaratinguetá, 2016.

Resumo

O maior desafio no desenvolvimento de materiais para aplicações biomédicas é fazer com que estes tenham uma boa resposta e interação com o meio quando inseridos no corpo. Estudos sobre a topografia de superfície mostram que nanotubos de TiO_2 podem contribuir para uma melhor adesão celular pois auxiliam a osseointegração e ancoragem óssea, entretanto essa mesma estrutura de superfície pode induzir o acúmulo e proliferação de bactérias na superfície do implante causando infecções e até mesmo a perda do implante. Nesse trabalho foi estudada a incorporação, ação antibactericida e fungicida da clorexidina na superfície da liga Ti-7,5Mo após o crescimento de nanotubos de TiO_2 por oxidação anódica. As amostras foram divididas em dois grupos de acordo com o potencial de anodização de 10V e 20V com tempo de permanência de 24 horas, seguido de calcinação a 450ºC por 1 hora e resfriamento no forno. A partir destes procedimentos foram utilizadas técnicas de caracterização da superfície: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para analisar a morfologia da superfície tal como a composição química do filme formado. O ângulo de contato foi medido para analisar a molhabilidade da superfície do material e o ensaio eletroquímico mostrou o comportamento do material em meio SBS. A clorexidina foi incorporada na superfície por imersão por 30 minutos e se mostrou um bom agente bactericida e antifúngico em ação contra S. Aureus e Candida em estudos in vitro.

Palavras-Chave: Ti-7,5Mo. TiO_2. Biomateriais. Oxidação. Anódica. Clorexidina.

OLIVEIRA, L. L**. Incorporation of Chlorhexidine on Ti-7,5Mo alloy surface after the growth of TiO2 Nanotubes.** – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Guaratinguetá, 2016.

Abstract

The challenge when developing materials for biomedical applications is to ensure that they have a good response and interaction when in the body. Studies about the surface topography show that TiO2 nanotubes can bring a better cell adhesion because they help osseointegration and bone anchorage, however, this same surface structure can induce the accumulation and bacteria proliferation in the implant surface causing infections and even loss of the implant. This study brings the incorporation and bactericidal action of chlorhexidine on the surface of Ti-alloy 7,5Mo after growth of TiO2 nanotubes by anodic oxidation. The samples weregrouped according to the anodizing potential of 10V and 20V with time to 24 hours stay, followed by calcination at 450 ° C for 1 hour and cooling into the oven. From these procedures were used as surface characterization techniques: scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS) to examine the surface morphology such as the chemical composition of the film. The contact angle was measured to analyze the surface wettability of the material and the electrochemical assay showed the behavior of the material in the middle of SBS. Chlorhexidine was incorporated into the surface by immersing for 30 minutes and showed a good bactericide and antifungal action against S. Aureus and Candida in vitro.

Keywords: Ti-7,5Mo, TiO2, biomaterials, anodizing, chlorhexidine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Resposta do corpo humano ao implante em diferentes espaços de tempo: (a) absorção de moléculas de água sobre a superfície do implante (tempo de 10-9 nanosegundos); (b) absorção de proteínas sobre a superficie do implante sobre as moléculas de água (tempo de mili a micro (10-3 a 10-6) segundos; (c) absorção de células sobre a superfície do implante sobre as proteínas (segundos a dias)(adaptado de GEETHA *et al*., 2009)	16
FIGURA 2	Integração do tecido de implante dentário e contato íntimo com o tecido gengival na parte superior e osteogênese desejada na parte inferior afilada em vez de distância osteogênese	17
FIGURA 3	Representação esquemática do crescimento de nanotubos: (a) reação catodica; (b) reação anódica; (c) estado de transição da camada de TiO2 (d) inicio da formação dos nanotubos de titania (MINAGAR et al., 2012)	18
FIGURA 4	Célula eletroquímica para anodização	27
FIGURA 5	Esquema dos (a) processos que ocorrem durante a anodização do titânio em eletrólitos contendo fluor; (b) Formação de nanotubos de TiO2	28
FIGURA 6	Mecanismo de formação do nanotubo (a) Movimentação dos íons no eletrólito e na camada de óxido formando a camada rica em fluor; (b) deformação plástica e formação dos nanotupos; (c) Nanotupos formado e a camada rica em F^- desaparece devido a formação dos complexos de fluor.	31
FIGURA 7	A solubilidade de TiO2 depende o pH do eletrólito e é a maior para níveis de pK mais ácido.	32
FIGURA 8	O envelhecimento do eletrólito leva a um aumento da condutibilidade elétrica e formação de nanotubos mais longos.	33

FIGURA 9	Relação entre o potencial aplicado e os diâmetros interno e externo dos nanotubos.	35
FIGURA 10	Fluxograma da metodologia empregada neste trabalho	40
FIGURA 11	(a) Titânio e (b) Molibdênio no processo de fundição e processamento da liga	41
FIGURA 12	Seqüência para produção do lingote: (a) Materia prima para obtenção da liga; (b) Fusão; (c) Resfriamento e obtenção do lingote	42
FIGURA 13	Forno tubular de atmosfera controlada	43
FIGURA 14	(a)Equipamento para forjamento rotativo a frio FENN modelo 3F	43
FIGURA 15	Amostras de 8 mm utilizadas nos ensaios (a) Amostra de lixada; (b) Amostra polida; (c) Amostra anodizada e calcinada	45
FIGURA 16	Etapas para adaptação da amostra (a) porta amostra, (b) amostra, (c) borracha de vedação e (d) tampa do porta amostra	46
FIGURA 17	Montagem da célula eletroquímica para anodização: (a) 80 ml do eletrólito com o suporte e contra-eletrodo, (b) célula montada com as conexões positiva no eletrodo de trabalho e negatina no contra-eletrodo, (c) fonte de alimentação	46
FIGURA 18	(a) Célula montada para anodização; (b) Conjunto de células trabalhando simultaneamente na produção de amostras anodizadas	47
FIGURA 19	Forno Mufla EDG com aquecimento por resistência elétrica usado para processo de calcinação; (b) Interior do forno	48
FIGURA 20	Incorporação da clorexidina por imersão	49
FIGURA 21	Microscópio Eletrônico de Varredura MEV	50

FIGURA 22	Esquema da medida do ângulo de contato sobre uma superfície metálica	51
FIGURA 23	Análise do ângulo de contato	51
FIGURA 24	(a)Equipamento completo de difração de raios X e (b) aproximação do canhão e suporte de amostras	52
FIGURA 25	Potenciostato/Galvanostato e gaiola de Faraday	53
FIGURA 26	Célula de corrosão (a) montagem e (b) disposição na gaiola de Faraday	54
FIGURA 27	Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV- FEG) da liga Ti-7,5Mo para as amostras: Anodizadas a 10V durante 24 horas e calcinadas a 450 °C (a) menor (b) maior aumento	57
FIGURA 28	Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV- FEG) da liga Ti-7,5Mo para as amostras: Anodizadas a 20V durante 24 horas e calcinadas a 450 °C (a) menor (b) maior aumento	58
FIGURA 29	Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura MEV-FEG do comprimento dos nanotubos de TiO2 na superfície da ligade TiO2.	59
FIGURA 30	Análise EDS (a) Espectro dos elementos encontrados em 10 V; (b) Espectro dos elementos encontrados em 20 V	60
FIGURA 31	Espectros de raios-X da liga sem o tratamento de anodização e para as amostras anodizadas em 10 V e 20 V	61
FIGURA 32	Imagem do ensaio para medida do ângulo de contato: (a) Amostra anodizada em 10V; (b) Amostra anodizada em 20V	62
FIGURA 32	Curva de potencial em circuito aberto para as três condições da liga de Ti-7,5Mo	63
FIGURA 34	Curva de polarização condições da liga de Ti-7,5Mo	64

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Propriedades mecânicas do sistema binário Ti-Mo	15
QUADRO 2	Classificação dos biomateriais baseada na sua interação com o tecido circulante	20
QUADRO 3	Exemplo de aplicações de materiais metálicos no corpo humano	21
QUADRO 4	Principais propriedades mecânicas de materiais metálicos em aplicações biomédicas	22
QUADRO 5	Propriedades mecânicas do sistema binário Ti-Mo	23
QUADRO 6	Métodos mecânicos de modificação da superfície	24
QUADRO 7	Métodos físicos de modificação da superfície	25
QUADRO 8	Métodos físicos de modificação da superfície	26
QUADRO 9	Propriedades físicas das formas alotrópicas do dióxido de titânio	36
QUADRO 10	Divisão dos grupos de acordo com o potencial de anodização	45
QUADRO 11	Valores médios dos diâmetros e comprimento dos nanotubos obtidos programa ImageJ	56
QUADRO 12	Quadro comparativo	62
QUADRO 13	Parâmetros dos valores eletroquímicos	65
QUADRO 14	Atividade bactericida da clorexidina 2% S. Aureus	66
QUADRO 15	Atividade fungicida da clorexidina 2% Candida	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 15

1.1 JUSTIFICATIVA..... 19

1.2 OBJETIVO..... 17

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO..... 18

2.CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 20

2.1 TECNICAS DE MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE..... 24

2.2 OXIDAÇÃO ANÓDICA E O MECANISMO DE FORMAÇÃO DO NANOTUBO DE TIO_2..... 27

2.3 A INFLUÊNCIA DO POTENCIAL DE ANODIZAÇÃO E DENSIDADE DE CORRENTE..... 34

2.4 PROPRIEDADE DO ÓXIDO DE TITÂNIO..... 35

2.5 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA À CORROSÃO DE NANOTUBOS DE TIO2. 37

2.6 ATIVIDADE BACTERICIDA E FUNGICIDA DOS NANOTUBOS DE TIO2 E A INCORPORAÇÃO DA CLOREXIDINA..... 38

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 40

3.1 OBTENÇÃO DA LIGA..... 41

3.2 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA..... 42

3.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE..... 44

3.3.1 Preparo das amostras..... 44

3.3.2 Oxidação anódica ou anodização..... 45

3.3.3 Esterilização..... 48

3.3.4 Incorporação da clorexidina..... 48

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE..... 49

3.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)..... 49

3.4.2 Ângulo de contato..... 50

3.4.3 Difração de raios x..... 52

3.4.4 Ensaio eletroquímico de resistência à corrosão..... **53**

3.5 CULTURA DE BACTÉRIA..... 55

3.5.1 O microorganismo..... 55

3.5.2 O biofiome..... 55

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... **56**

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DA SUPERFÍCIE..... 56

4.2 ÂNGULO DE CONTATO..... 61

4.3 ENSAIO ELETROQUÍMICO..... 63

4.4 ESTUDOS IN VITRO..... 65

5. CONCLUSÃO..... **67**

REFERÊNCIAS..... **68**

1. INTRODUÇÃO

Biomateriais metálicos são empregados para restaurar a função de tecidos duros sendo empregados por exemplo na fabricação de implantes dentários, próteses ortopédicas, e placas de síntese. Os metais mais empregados para essas aplicações são o aço inoxidável, ligas de cobalto-cromo, se destacando o emprego do titânio e suas ligas na confecção de implantes dentários (KULKARNI et al., 2014). O desempenho de diversas ligas de titânio foram avaliados por diversos autores buscando propriedades como módulo de elasticidade próximo ao do osso humano, além de elevada relação resistência/peso (HO, 1999), (PATEL, GOHIL 2012), (CHEN, 2015), (NEACSU, 2015) entre outros.

Na década de 1990, (Ho et al., 1999) avaliaram as propriedades do sistema binário titânio-molibdênio. Os autores verificaram que algumas ligas de sistema possuíam propriedades de volume que tornavam o seu uso indicado em aplicações biomédicas. De acordo com o quadro 1 pode ser observado que a liga Ti-7,5Mo (%m/m) apresenta módulo de elasticidade reduzido além de excelente relação resistência/peso.

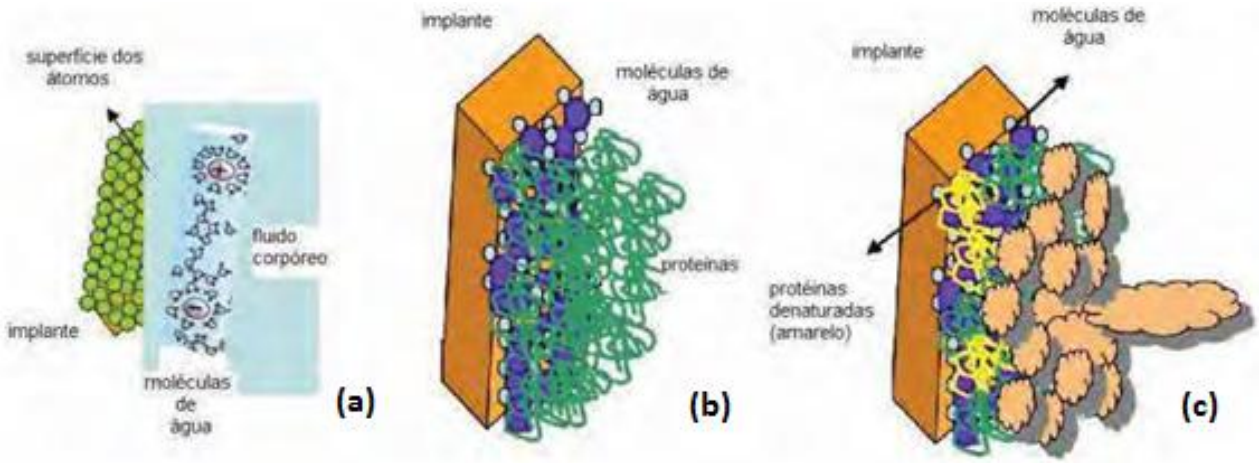
Quadro 1 – Propriedades Mecânicas do sistema binário Ti-Mo Fonte: (HO et al., 1999)

Liga (% p Mo)	**Propriedades Mecânicas**		
	Dureza(VH 200g)	**Módulode Elasticidade (GPa)**	**Limite de Resistênciaà tração (MPa)**
Ti-6Mo	270	70	1480
Ti-7,5Mo	**265**	**55**	**1400**
Ti-9Mo	320	78	1485
Ti-10Mo	347	97	1780
Ti-12,5Mo	348	84	1420
Ti-15Mo	310	70	1380
Ti-17Mo	310	78	1650
Ti-20Mo	305	86	1620

Fonte: (HO et al., 1999) adaptado

No entanto, esses materiais além de exibir excelente biocompatibilidade também devem apresentar propriedades de superfície que possibilitem uma excelente resposta após sua inserção no meio biológico. Uma representação esquemática mostrando a interação biomaterial/meio biológico foi proposta por (Geetha et al., 2009) e pode ser visualizada na Figura 1.

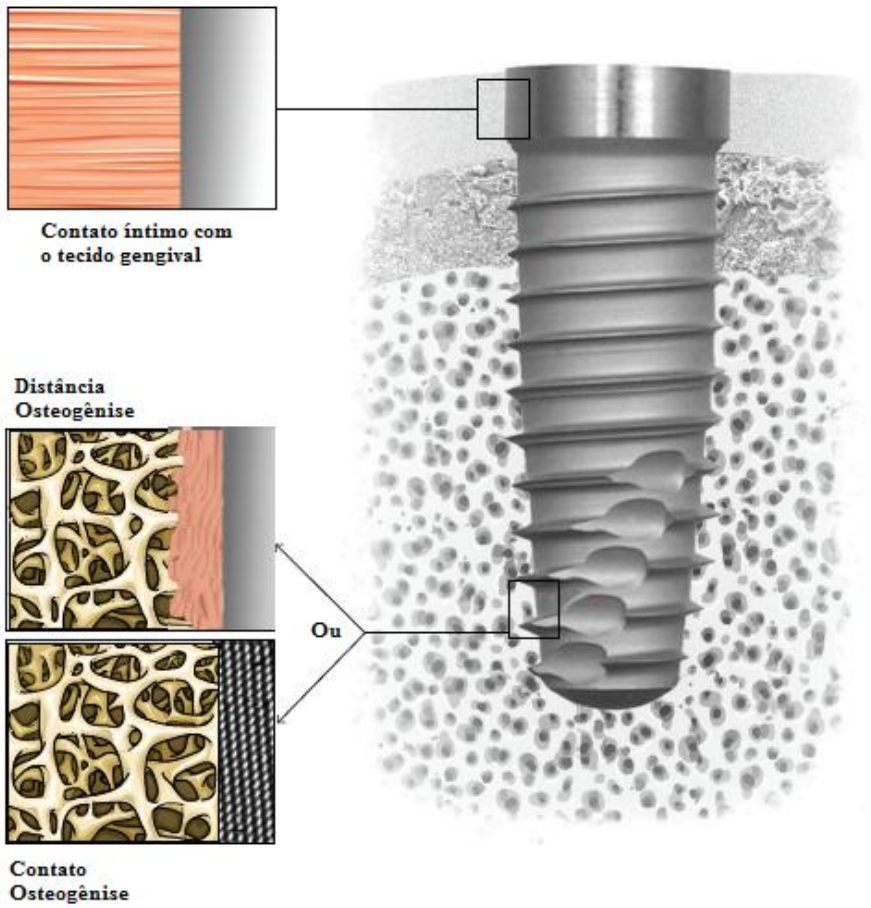
Figura 1 - Resposta do corpo humano ao implante em diferentes espaços de tempo: (a) absorção de moléculas de água sobre a superfície do implante (tempo de 10-9 nanosegundos); (b) absorção de proteínas sobre a superficie do implante sobre as moléculas de água (tempo de mili a micro (10-3 a 10-6) segundos; (c) absorção de células sobre a superfície do implante sobre as proteínas (segundos a dias)



Fonte: (GEETHA *et al*., 2009) adaptado

Além das propriedades de volume e superfície, materiais empregados na fabricação de implantes dentários devem também exibir uma excelente osseointegração, com perfeita junção tecido epitelial/implante (Figura 2). O primeiro passo na osseointegração de um implante é chamado estabilidade primaria e está relacionado com a ancoragem mecânica do implante. A estabilidade secundária que vem após a diminuição da estabilidade primaria, é caracterizada pela união biológica tecido ósseo/implante (LAVENUS et al., 2010)

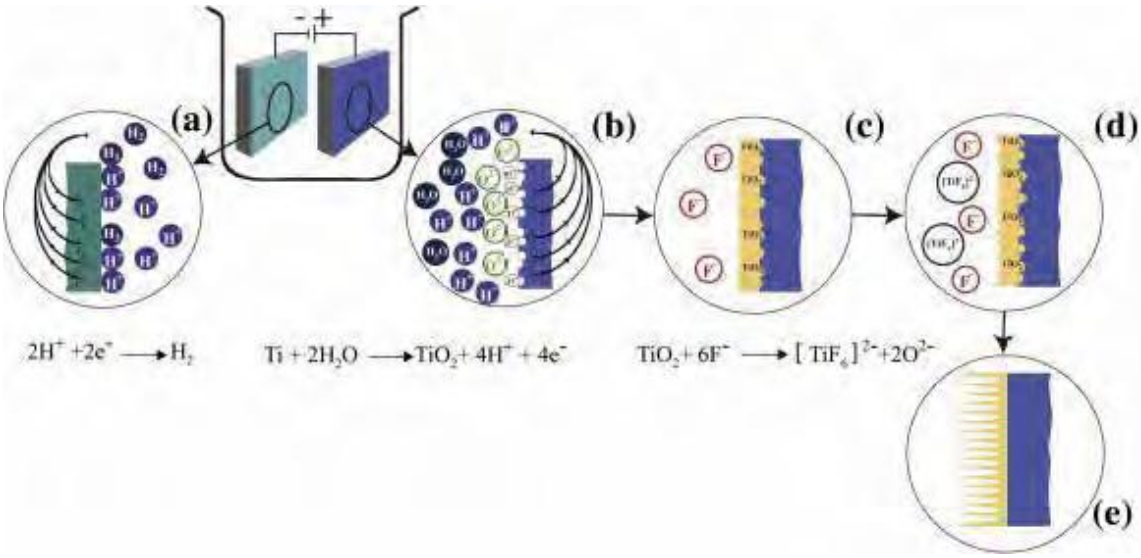
Figura 2 - Integração do tecido de implante dentário. Contato íntimo com o tecido gengival na parte superior e a osteogênese contato desejado na parte inferior afilada em vez de distância osteogênese.



Fonte – (LAVENUS et al., 2010) adaptado

As técnicas de modificação de superfície têm sido desenvolvidas buscando melhor resposta após osseointegração. Superfícies nanoestruturadascontendo nanotubos de TiO_2 obtidas a partir de processos de oxidação anódica (Figura 3) podem apresentar uma melhor interação, exibindo melhor molhabilidade e energia de superfície.

Figura 3 - Representação esquemática do crescimento de nanotubos: (a) reação catodica; (b) reação anódica; (c) estado de transição da camada de TiO2 (d) inicio da formação dos nanotubos de óxido de titânio



Fonte: (MINAGAR et al., 2012) adaptado

O crescimento de nanotubos na superfície da liga Ti-7,5Mo visando a sua utilização na fabricação de implantes de dentários foi avaliado por Escada et al., (2013). Esses autores avaliaram diversos parâmetros do processo como eletrólito, voltagem e tempo de anodização. O crescimento de nanotubos de TiO_2 na superfície desses materiais possibilitou a formação de superfícies rugosas com boa adesão celular para todas as composições avaliadas (ESCADA et al, 2012).

Além da osseointegração o sucesso de um implante estará relacionado também com a ausência de processos infecciosos. A peri-implantite é definida como um processo inflamatório infeccioso que afeta os tecidos ao redor do implante osseointegrado em função, resultando em perda do osso de suporte (BRANEMARK, 1987) e (ALBREKTSSON et al., 1986).

Dessa forma, a produção de um material com excelentes propriedades de volume e superfície e capaz de inibir processos infecciosos é um grande desafio no estudo desses materiais. Devido a sua estrutura oca e área especifica de superfície, nanotubos de TiO2 podem ser empregados como sistemas locais para liberação de medicamentos,

fatores de crescimento e hormônios, proporcionando dessa forma melhor osseointegração e crescimento ósseo.

1.1 JUSTIFICATIVA

A partir do exposto o presente trabalho teve como objetivo, a partir de estudos prévios realizados com a liga Ti-7,5Mo, associar o crescimento de nanotubos à incorporação de agente microbiano buscando a obtenção de um material para aplicações biomédicas com propriedades de volume e superfície que correspondam às exigidas para tal aplicação:

Dessa forma foram realizados os seguintes objetivos específicos:

I. Utilização dos recursos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) para análise da morfologia dos nanotubos de TiO2 anodizados em 10 V e 20 V e calcinadas;
II. Análise das fases cristalinas por meio da Difração de Raios – X nos filmes anodizados em 10 V e 20 V e calcinadas;
III. Análise da molhabilidade e ângulo de contato na superfície dos nanotubos anodizados em 10 V e 20 V e calcinadas;
IV. Ensaio elétroquímico em meio de Fluido Corporal Simulado (SBF – Simulated Body Fluid) na superfície da liga TiO2, superfícies anodizadas em 10 V e 20 V após a calcinação;
V. Estudo in vitro para análise da capacidade bactericida e fungicida da clorexidina incorporada por imersão nas superfícies anodizadas em 10 V e 20 V após a calcinação.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O que vai definir o sucesso de um material quando implantado no corpo humano é a sua resposta com relação a interação com o meio, ou seja, a sua biocompatibilidade. Esse termo foi definido por (WILLIAMS et al., 1981) na década de 1980 como sendo "a habilidade de um material desempenhar uma função com uma resposta adequada do hospedeiro". Ainda segundo o autor, as variáveis que influenciam a biocompatibilidade serão o material (propriedades de volume e superfície), o hospedeiro e a interação implante/tecido.

Recentemente, (CHEN et al., 2015) limitaram o uso do termo biomaterial para aqueles materiais empregados em aplicações onde existe um contato íntimo do material com tecidos vivos**.** Os biomateriais podem ainda ser subdivididos de acordo com a resposta do hospedeiro em biotolerantes, bioativos e bioarreabsorvíveis conforme quadro 2. O termo material biomédico é mais amplo englobando os dispositivos protéticos aplicados com ou sem contato íntimo com o tecido vivo.

Quadro 2 – Classificação dos biomateriais baseada na sua interação com o tecido circundante

Classificação	Resposta	Exemplos	Efeito
Materiais Biotolerantes	Formação de tecido conjuntivo fino cápsulas (0,1-10µm) e a cápsula não adere à superfície do implante.	Politetrafluoroetileno (PTFE),Polimetacrilato (PMMA), titânio Co-Cr	Rejeição levando a falha e perda do implante
Materiais Bioinertes	Formação de tecido ósseo em torno do material e forte integração com a superfície do implante	Biovidro, fosfato de cálcio sintético incluindo hidroxiapatita (HAP)	Aceitação do implante pelo organismo
Materiais Bioabsorvíveis	Substituído pelo tecido do organismo	Ácido poliláctico e polímeros poliglicólico e enxertos ósseos transformados de compósitos todos os extratos de tecidos ou proteínas e sistema de apoio estrutural	Aceitação do implante pelo organismo

Fonte: (GEETHA et al. , 2009) adaptado

O estudo do emprego de materiais metálicos, cerâmicas, polímeros e compósitos nessa área tem se intensificado nos últimos anos. Os metais como aço inoxidável, ligas de cobalto-cromo e titânio, apresentam papel de destaque em aplicações que envolvem esforços mecânicos como próteses de joelho, próteses de quadril, parafusos e placas de síntese (quadro 3). O sucesso da sua utilização se deve as suas propriedades mecânicas e resistência à corrosão (quadro 4).

Quadro 3 - Exemplos de aplicações de materiais metálicos no corpo humano.

Tipos de Materiais	Aplicações
Aços Inoxidáveis	Usadas para substituir (quadril, joelho), placa para fixar fraturas, válvulas do coração, partes da coluna vertebral, instrumentos cirúrgicos, parafusos, pinos para quadril, próteses de ombro.
Ligas de Cobalto-Cromo	Placa para fixar fraturas, parafusos para implantes dentários, marca passo, odontologia, próteses ortopédicas, mini placas, instrumentos cirúrgicos, usadas para substituir (quadril, joelho).
Titânio e suas ligas	Substituição do coclear, usadas para substituir (quadril, joelho), implantes dentários, parafusos, suturas, partes para cirurgias ortodônticas, dispositivos para fixação de ossos (pinos), válvulas para coração e instrumentos cirúrgicos.

Fonte: (PATEL; GOHIL, 2012) adaptado

Quadro 4 – Principais propriedades mecânicas de materiais metálicos empregados em aplicações biomédicas.

Material	Módulo de Young (GPa)	Tensão limite de escoamento (MPa)	Limite de Resistência à Tração (MPa)	Limite de Resistência à fadiga (MPa)
Aços Inoxidáveis	190	221 – 1213	586 – 1351	241 – 820
Ligas de Co-Cr	210 – 253	448 – 1606	655 – 1896	207 – 950
Titânio	110	485	760	300
Ti-6Al-4V	116	896 – 1034	965 – 1103	620
Osso Cortical	15 - 30	30 – 70	70 – 150	

Fonte: (PATEL; GOHIL, 2012) adaptado

Na década de 1990, ligas do sistema binário Ti-Mo (6-20 %p) foram avaliadas por (HO et al., 1999). Nesse estudo, os autores avaliaram as fases presentes, a estrutura cristalina em função da porcentagem de molibdênio, propriedades mecânicas como dureza, módulo de elasticidade e resistência à flexão. A partir dos valores encontrados após a realização dos ensaios (quadro 5), a liga Ti-7,5Mo foi quem exibiu os melhores resultados com relação ao módulo de elasticidade (55 GPa) e resistência à corrosão (HO *et al.*, 1999).

Quadro 5 – Propriedades Mecânicas do sistema binário Ti-Mo.

Liga (% p Mo)	**Propriedades Mecânicas**		
	Dureza(VH 200g)	**Módulo de Elasticidade (GPa)**	**Limite de Resistência à tração (MPa)**
Ti-6Mo	270	70	1480
Ti-7,5Mo	**265**	**55**	**1400**
Ti-9Mo	320	78	1485
Ti-10Mo	347	97	1780
Ti-12,5Mo	348	84	1420
Ti-15Mo	310	70	1380
Ti-17Mo	310	78	1650
Ti-20Mo	305	86	1620

Fonte: (HO et al., 1999) adaptado.

Em 2007, a partir de análises histológicas de implantes cilíndricos de Ti-7,5Mo feitos no fêmur de coelhos Lin e seus colaboradores foram capazes de observar e avaliar a osseointegração ao redor dos implantes. Eles verificaram que além de uma excelente biocompatibilidade interface material/osso o material também mostrou uma interação duas vezes superior a liga Ti6Al4V, sugerindo então, que a liga binária fosse aplicada para implantes dentários.

Apesar dos excelentes resultados apresentados pela liga com relação as suas propriedades de volume, as ligas de titânio assim como todos os biomateriais metálicos, são consideradas bioinertes. Dessa forma a modificação de suas propriedades de superfície, como topografia, química e energia a partir da realização de tratamentos de

superfície podem resultar em uma melhor interação com o meio após a inserção do implantes resultando em melhor resposta.

2.1. TÉCNICAS DE MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE

Diversas técnicas de modificações de superfície foram estudadas nos últimos anos buscando uma melhor interação entre a interface osso/metal implantado. As técnicas de modificações na superfície podem ser divididas em três categorias: métodos mecânicos, métodos químicos e métodos físicos (KULKARNI et al., 2014). Os métodos mecânicos são usados para obter uma superfície rugosa por processos de adição ou subtração, proporcionando melhor embricamento devido ao aumento da área superficial. Os principais métodos mecânicos são dados no quadro 6.

Quadro 6 – Métodos mecânicos de modificação da superfície.

Métodos Mecânicos	Camada Modificada	Objetivos
Lixamento **Polimento** **Usinagem** **Jateamento**	Superfície lisa ou rugosa a partir de processos de subtração	Produz superfície com topografia específica, superfície limpa e rugosa

Fonte: (KULKARNI et al., 2014) adaptado

Os métodos químicos são basicamente reações químicas que ocorrem entre a superfície do titânio e suas ligas e uma solução durante o tratamento. Os tratamentos químicos têm como objetivo melhorar a biocompatibilidade e a integração óssea além de aumentar a resistência à corrosão e promover a remoção da contaminação proporcionando a superfície do titânio características bioativas. No Quadro 7 são apresentados os principais metodos químicos empregados para modificação de superfície.

Quadro 7 – Métodos químicos de modificação da superfície.

Métodos Químicos	Camada Modificada	Objetivos
Tratamento ácido	Menor que 10 nm, camada de óxido de superfície.	Remover as escamas de óxido e contaminação.
Tratamento Alcalino	Aprox. 1 µm de gel de titanato de sódio.	Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou condutividade óssea.
Peróxido de hidrogênio	Aprox. 5 nm de óxido interior densa e camada externa porosa.	Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou osso condutividade.
Sol-gel	Aprox. 10 µm de película fina, tal como fosfato de cálcio, TiO2 e sílica.	Melhorar a biocompatibilidade, bioatividade ou condutividade óssea.
Deposição química de vapor - CVD	Aprox. 1µm of TiN, TiC, TiCN, diamond and diamond-like carbon thin film.	Melhorar a resistência ao desgaste, resistência à corrosão e compatibilidade sanguínea.
Oxidação Anódica	**Aprox. 10 nm a 40µm de TiO2 camada, e adsorção incorporação de lectrólito ânions.**	**Melhora a resistência à corrosão, melhora a biocompatibilidade e a bioactividade ou condutividade óssea. Remoção de contaminantes.**
Métodos Bioquímicos	Revestimento e modificação através monocamadas,etc.	Induzir a resposta de células e tecidos aumentando a biocompatibilidade além de ser mais resistente à corrosão e ao desgaste.

Fonte: (KULKARNI et al., 2014) adaptado

Nos métodos físicos de modificação da superfície, diferentemente do método químico, não há interação química, apenas é realizado o recobrimento da superfície do substrato em camadas, graças a interação da energia térmica, cinética e elétrica envolvida no processo. No quadro 8 são apresentados os principais métodos físicos.

Quadro 8 – Métodos físicos de modificação da superfície.

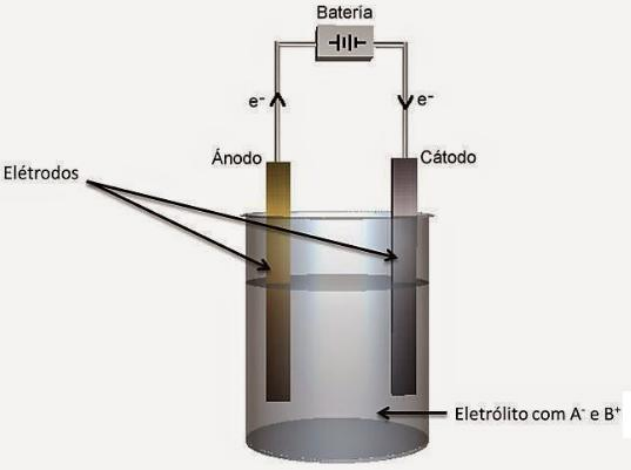
Métodos Físicos	Camada Modificada	Objetivos
Thermal spray **Flame spray** **Plasma spray high velocity** **Oxy-fuel spray**	30-200 µm de revestimentos, tais como o titânio, silicato de cálcio, Al2O3, ZrO2, TiO2.	Melhorar a resistência ao desgaste, e resistência à corrosão e as propriedades biológicas.
Deposição física à vapor **Evaporação** **Ion plating** **Sputtering**	1 µm de TiN, TiC, TiCN, filmes de diamante, filmes finos de carbono, revestimento de hidroxiapatita por pulverização catódica.	Melhorar a resistência ao desgaste, e resistência à corrosão e compatibilidade sanguínea.
Deposição de íons	10 nm de superfície modificada camada e / ou película fina.	Modificar a composição da superfície; melhorar o desgaste, resistência à corrosão e a biocompatibilidade.
Tratamento de plasma de descarga luminescente	1 nm – 100 nm de superfície modificada.	Limpeza, esterilização ou oxidando a superfície; nitretação de superfície; remoção da camada de óxido nativo.

Fonte: (KULKARNI et al., 2014) adaptado

2.2 OXIDAÇÃO ANÓDICA E O MECANISMO DE FORMAÇÃO DO NANOTUBO DE TIO_2

O filme de óxido auto-organizado de TiO_2 pode ser obtido por meio da oxidação anódica. Para que a anodização ocorra, é necessária a presença de um contra-eletrodo (catodo), um eletrodo de trabalho (anodo), o meio eletrolítico ou eletrólito que viabilize a movimentação de íons na solução e a aplicação de um potencial mínimo necessário. Todos estes elementos formam a célula eletrolítica que viabiliza o processo de oxidação anódica como mostra a figura 4:

Figura 4 – Célula eletroquímica para anodização



Fonte: Autor

Obter a formação organizada de uma matriz de nanotubo de TiO_2 depende do controle de vários parâmetros que vem sendo estudados a fim de se entender o mecanismo do controle da formação dessas estruturas (KUBOTA et al., 2004; MACAK et al., 2005; TAVEIRA et al., 2005; REGONINI et al., 201).

A maioria do volume de pesquisas que envolvem estruturas auto-organizadas de TiO_2 utiliza as soluções de anodização que contém íons fluoreto diluídos no meio. Em resumo os fenômenos que ocorrem em meios da reação contendo fluoreto acontecem da seguinte forma:

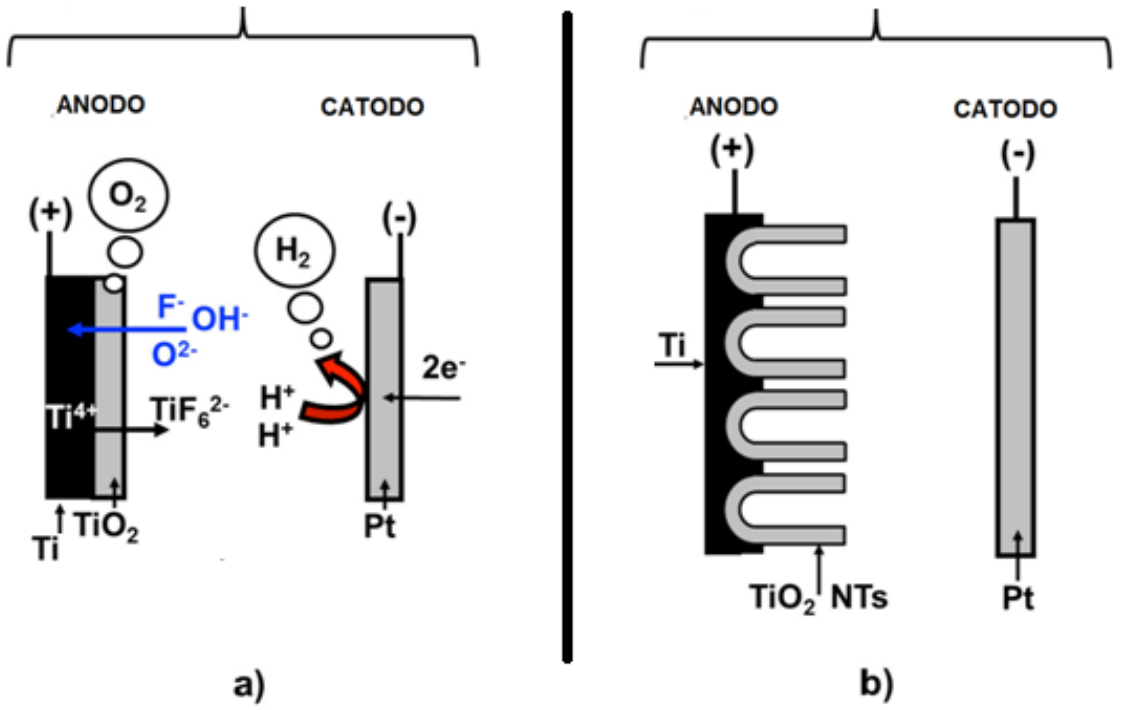
1) Inicialmente o campo elétrico aplicado conduz íons Ti^{4+} a partir do substrato de Ti para o eletrólito, onde se combinam com íons F^- para formar um complexo estável hexafluoreto de titânio, $[TiF6]^{2-}$.

2) Ânions O^{2-} e OH^- provenientes da dissociação da água e F^- migram em direção ao ânodo (superfície da liga) e ocorre a formação de bolhas de hidrogênio no cátodo.

3) Íons adicionais do eletrólito também irão migrar em direção ou para longe do ânodo, dependendo da sua carga eletrostática e pode ser incorporado dentro do filme.

A presença de F^-, faz com que o óxido dissolva, sendo crucial para a formação da porosidade no filme e conseqüentemente, na formação de nanotubos de TiO_2, como mostrado na figura 5.

Figura 5 - Esquema dos (a) processos que ocorrem durante a anodização de Ti em eletrólitos contendo flúor; (b) formação de nanotubos de TiO_2.



Fonte – (REGONINI et al., 2013) adaptado.

Geralmente o processo de crescimento de nanotubos de TiO2 com eletrólitos contendo íons fluoreto é realizado sob condições potenciostáticas, pois este oferece melhores condições de controle dos parâmetros que afetam o processo.

O processo de oxidação anódica está descrito em etapas e pode ser aplicado tanto para soluções aquosas como orgânicas contendo íons fluoreto e água (REGONINI et al., 2013).

A primeira etapa da oxidação anódica acontece com a oxidação do anodo (metal) o qual libera elétrons e íons Ti^{4+} (equação 1) que se combinam com OH^- e O^{2-} vindos da dissociação da água para formando um óxido hidratado (equação 2a) e o óxido (equação 2b).

$$Ti \rightarrow Ti^{4+} + 4e^- \quad (1)$$

$$Ti^{4+} + 4OH^- \rightarrow Ti(OH)_4 \quad (2a)$$

$$Ti \rightarrow O^{2-} + TiO_2 \quad (2b)$$

Em seguida, ocorre a liberação de água pela camada anódica hidratada através de uma reação de condensação (equação 3).

$$Ti(OH)_4 \rightarrow TiO_2 + 2H_2O \quad (3)$$

O potencial controla a taxa de imigração de íons na interface metal/óxido no anodo, e ao mesmo tempo, ocorre a formação de hidrogênio no catodo, como mostra a equação 4.

$$4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2 \quad (4)$$

A partir da soma de todas as reações acima, é dado o processo global de formação do óxido de titânio, na equação 5.

$$Ti + 2H_2O \rightarrow TiO_2 + 2H_2 \quad (5)$$

Além disso, os íons de fluoreto podem dissolver tanto o óxido quanto o óxido hidratado ou reagir com o Ti^{4+}. A presença de íons fluoreto F^- reage com os íons móveis no óxido (que pode ser explicado devido ao enfraquecimento das ligações de Ti e O pelo campo) levando a formação de complexos de flúor, sendo o TiF_6^{2-} o mais estável deles (equação 8).

$$TiO_2 + 6F^- + 4H^+ \rightarrow TiF_6^{2-} + H_2O \quad (6)$$

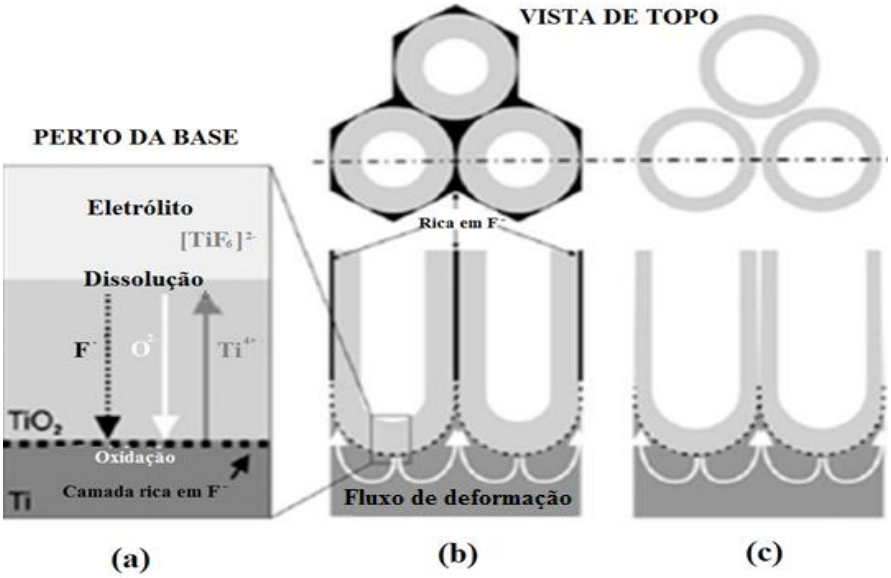
$$Ti(OH)_4 + 6F^- \rightarrow TiF_6^{2-} + 4OH^- \quad (7)$$

$$Ti^{4+} + 6F^- \rightarrow TiF_6^{2-} \quad (8)$$

Acredita-se que há uma competição entre a formação do óxido (equações 2 e 3) e da e da dissolução (equações 6 ao 8) e isso é o que determina a estrutura de TiO_2 formada.

(BEGER et al., 2011) explica de forma esquemática a o mecanismo de formação dos nanotubos pela movimentação dos íons no óxido e na solução eletrólito. Ele diz que a transição de nanoporos para nanotubos acontece devida a camada rica em fluoreto na parede exterior de cada célula individual de TiO_2 que se movimenta e se deforma pois a força de junção na base das células é menor que nas pares, levando a uma deformação e formação dos nanotubos graças ao fluxo dos íons que, segundo (CHU at al., 2005), são influenciados pela densidade de corrente e potencial aplicado. Na figura 6 é possível entender com mais clareza esse mecanismo.

Figura 6 - Mecanismo de formação do nanotubo (a) Movimentação dos íons no eletrólito e na camada de óxido formando a camada rica em fluor; (b) deformação plástica e formação dos nanotupos; (c) Nanotupos formado e a camada rica em F^- desaparece devido a formação dos complexos de fluor.



Fonte: (BEGER et al., 2011) adaptado

2.3 A INFLUÂNCIA DO ELETRÓLITO NA OXIDAÇÃO ANÓDICA

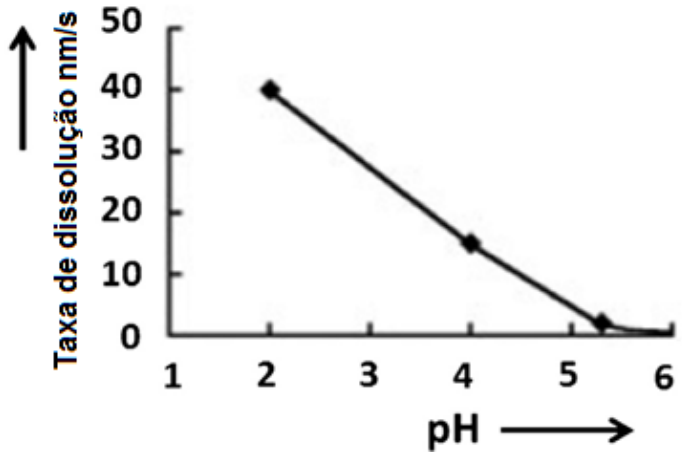
Partindo do mecanismo de crescimento dos nanotubos explicado anteriormente, sabemos então que o crescimento do nanotubo de TiO_2 ocorre na base do poro, mais especificamente na interface metal/óxido, enquanto que a dissolução do óxido acontece de forma uniforme na ao longo de toda a totalidade do nanotubo, iniciando na interface oxido/eletrólito no caso de meios aquosos. Por meio de estudos, muitos pesquisadores afirmam que o equilíbrio entre o crescimento e dissolução do TiO_2 pode ser modificado alterando alguns dos parâmetros que interferem neste processo.

Visto que o eletrólito é o meio que viabiliza o processo do crescimento e dissolução do óxido na oxidação anódica, além da natureza do eletrólito (orgânica ou aquosa) tais fatores como pH, teor de fluoreto e o envelhecimento são alguns dos parâmetros que influenciam nesse processo. A resistência do eletrólito e processos de

difusão geralmente não são considerados os fatores limitantes do crescimento (THÉBAULT at al., 2008), e por isso não serão discutidos neste trabalho. O potencial aplicado, densidade de corrente gerada, tempo e temperatura devem ser levados em conta durante o crescimento de nanotubos de TiO_2 e andamento deste trabalho.

Um dos fatores relacionados ao eletrólito que influenciam na dissolução e conseqüentemente no crescimento do TiO_2 é o pH da solução, que tem uma capacidade de dissolução mais eficiente em teores de pH mais baixos, ou seja, a velocidade de dissolução aumenta quando o meio eletrolítico é mais ácido, como mostra a figura 7 (MACAK et al., 2005). Isso explica a razão pela qual a dissolução do óxido anódico de TiO_2 é maior quando usado ácido fluorídrico ao invés de solução com sais de fluoreto.

Figura 7 – A solubilidade de TiO_2 depende do pH do eletrólito e é maior para níveis de pH ácido



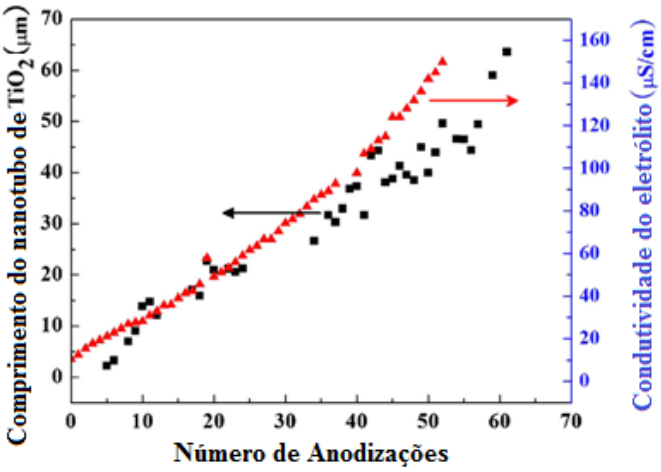
Fonte: (MACAK et al., 2005) adaptado

Com relação à concentração de íons fluoreto que também afeta o pH da solução, (MACAK et al., 2008) em seguida (CHEN et al., 2013) mantiveram a concentração desses íons na ordem de 0,3 – 0,5% em peso, assegurando com isso, o crescimento ordenado mais eficiente dos nanotubos de TiO_2.

O envelhecimento do eletrólito está diretamente ligado com a concentração de $TiF6^{2-}$ dissolvidos no meio. Este influencia de uma forma “positiva” durante o processo

de formação organizada dos nanotubos em meios orgânicos segundo (LI, et al., 2009). A maior concentração de $TiF6^{2-}$ se traduz em uma menor taxa de dissolução química que leva a um aumento do crescimento do óxido e nanotubos bem definidos. Foi observado que a reutilização do eletrólito orgânico aumenta a condutividade elétrica (PRAKASAM, et al., 2007), que pode ser explicada devido ao aumento de $TiF6^{2-}$ no eletrólito que foram formados em anodizações anteriores, além de um maior volume de água devido a absorção da umidade. Na figura 8 é possível notar o efeito da condutibilidade no crescimento dos nanotubos. Segundo (LEE et al., 2008) aumentando a condutibilidade no eletrólito, aumenta-se também a taxa de crescimento de nanotubos, uma vez que facilita a passagem da corrente necessária para formar o óxido.

Figura 8: O envelhecimento do eletrólito leva a um aumento da condutividade elétrica e formação de nanotubos mais longos



Fonte: (LEE at al., 2008) adaptado

Os nanotubos são geralmente cultivados em temperatura ambiente, ou seja, entre temperaturas que variam entre 20-25ºC. Dependendo do tipo de eletrólito combinada com a variação da temperatura, o crescimento dos nanotubos de TiO_2 podem sofrer influencias no seu mecanismo de crescimento. (WANG e LIN, 2009) em um estudo que verificava as influências do eletrólito na formação organizada de nanoestruturas de TiO_2 por anodização verificaram que o diâmetro dos nanotubos não depende da temperatura de anodização do meio, mas quando se utiliza um eletrólito orgânico, o diâmetro dos nanotubos são maiores em meios onde a temperatura é mais elevada. Eles

explicam também que em temperaturas mais baixas ocorre um aumenta da viscosidade do eletrólito que diminui a mobilidade dos íons de F^- e conseqüentemente a dissolução de TiO_2 e Ti.

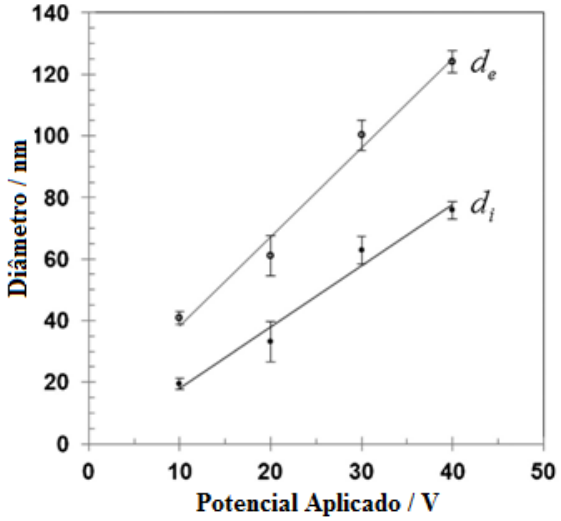
2.4 A INFLUÊNCIA DO POTENCIAL DE ANODIZAÇÃO E A DENSIDADE DE CORRENTE

O método mais usado para crescimento de filmes anodicos nanoestruturados tem sido o potenciostático, em contraste com o método galvanostático que apresenta maiores dificuldades para o controle do crescimento de nanotubos (TAVEIRA et al., 2006).

Sobre os métodos potenciostáticos utilizando eletrólitos aquosos, o potencial aplicado está na ordem de 5 a 30 V e para eletrólitos orgânicos e de 10 a 60 V para eletrólitos aquosos (MACAK et al., 2007) e (REGONINI et al., 2009). É o potencial aplicado que determina a intensidade do campo elétrico na superfície do óxido, interferindo na mobilidade dos íons e conseqüentemente no diâmetro dos nanotubos formados afirma (VALOTA et al., 2010). Em estudos que verificam fatores que influenciavam o crescimento do óxido de TiO_2, utilizando uma faixa de 20 – 50 V, Valota encontrou uma relação linear entre o potencial aplicado e o diâmetro dos nanotubos observados. Entretanto, essa relação não pode ser aplicada para potencias mais elevados, pois SU et al., (2011) verificou que o diâmetro das nanoestruturas porosas anodizadas diminui quando o potencial aplicado excede um valor crítico de 60 V.

(REGONINI at al., 2013) afirma que o potencial também influencia a densidade de corrente durante o processo de varredura até a escolha do potencial constante. Para varreduras na ordem de 100 mV / s^{-1} a 1 V / s^{-1}, é possível obter altas densidades de correntes e comprimentos de nanotubos se comparado com taxas de varreduras mais lentas. (TAVEIRA at al., 2005) estudando o início da formação dos nanotubos de TiO_2, acredita que há um limite de corrente que determina se um poro em formação vai sobreviver e desenvolver em um nanotubo ou cessar o crescimento.

Figura 9: Relação entre o potencial aplicado e os diâmetros interno e externo dos nanotubos



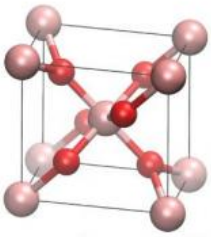
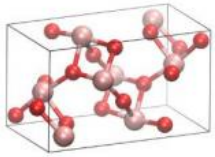
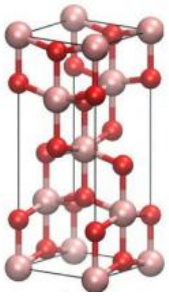
Fonte - [REGONINI et al., 2012] adaptado

2.5 PROPRIEDADES DO ÓXIDO DE TITÂNIO

O óxido de titânio TiO_2 presente no titânio suas ligas é termodinamicamente estável e existe em três formas alotrópicas: rutilo, bruquita e anatase. As fases anatase e rutilo são tetragonais, enquanto a bruquita possui estrutura cristalina ortorrômbica. Dentre essas três formas alotrópicas, a fase mais estável é o rutilo o qual quando comparado à anatase possui menor energia de superfície (SCHARNWEBER et al., 2002). Quando a superfície é formada apenas por rutilo é hidrofóbica, enquanto a superfície coberta por uma mistura de rutilo e anatáse é hidrofílica. (LIM et al., 2001)

No Quadro 9 podem ser verificadas algumas propriedades físicas das formas alotrópicas do dióxido de titânio. Embora uma diversidade de óxidos seja obtida quando se altera a temperatura de oxidação, as temperaturas elevadas são o principal obstáculo para uma forte adesão do oxido ao substrato. Uma fina camada de óxido (~ 32 nm) com boa adesão ao substrato é formada quando Ti CP é oxidado a 750 °C, enquanto uma camada com espessura maior (~ 1 μm) e com baixa adesão se forma quando a 1000 °C (HRUSKA *et al.*, 1999).

Quadro 9 – Propriedades físicas das formas alotrópicas do dióxido de titânio

Propriedades Físicas	**Rutilo**	**Bruquita**	**Anatase**
Célula Unitária	Tetragonal	Ortorrômbica	Tetragonal
Parâmetros de rede (Å)	$a_o = 4,58$ $c_o = 2,98$ 	$a_o = 9,17$ $b_o = 5,43$ $c_o = 2,98$ 	$a_o = 3,78$ $c_o = 9,50$ 
Densidade (g/cm^3)	4,245	4,119	3,893
Volume molar (cm^3/mol)	18,817	19,393	20,519
Energia de formação (kJ/mol)	945	942	939
Constante dielétrica (ε)	110	78	48

Fonte: (VELTEN *et al*., 2002)

Após o processo de oxidação anódica, os nanotubos ainda possuem estrutura amorfa e precisam ser calcinadas para estabilização da estrutura cristalina. A anatase é formada em menores temperaturas de calcinação – entre 450-500ºC.A variação do potencial utilizado na anodização interfere no diâmetro dos nanotubos. Bauer e seus colaboradores mostraram que aumentando os potenciais de anodização conseqüentemente haverá um aumento do diâmetro dos nanotubos e das espessuras das paredes dos nanotubos. Evidentemente, a fase cristalina resultante depende no diâmetro dos nanotubos. Nos diâmetros menores que 30 nm a calcinação resultou na fase Rutilo e para diâmetros maiores, a Anatase.

CHAVEZ et al., (2016) avaliaram a temperatura de calcinação para a liga Ti-7.5Mo para aplicações biomédicas e verificaram que os nanotubos de TiO_2 foram transformadas do estado amorfo para o cristalino com fase presente Anatase em torno de 400 ◦C. Os resultados mostraram uma elevada estabilidade da nanoestrutura, uma vez que só para temperaturas de calcinação acima de 500 ◦C a fase cristalina Rutilo aparece presente.

2.6 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA À CORROSÃO DE NANOTUBOS DE TiO_2

A resistência à corrosão de ligas a base de titânio é um diferencial que leva a sua escolha para serem empregadas como biomateriais. A degradação de um biomaterial metálico após a sua inserção no corpo humano pode desencadear uma série de reações indesejáveis como reações inflamatórias, infecções e culminar com a perda do implante. (LIU et al., 2011).

A oxidação anódica é um tratamento químico de superfície que leva a um aumento da área de contato osso/implante e que também tem como resultado uma influencia positiva na resistência a corrosão do Ti-CO e suas ligas.

Dentre os parâmetros do processo de anodização que devem ser considerados, estudos têm sido focados na análise da influência da temperatura de calcinação na resistência à corrosão. PARK et al., (2010) avaliaram a resistência à corrosão de Ti-CP em solução SBF após a oxidação anódica à 20 V em eletrólito composto por glicerol, água e fluoreto de amônio (NH_4F) no intervalo de 2 horas. As amostras foram avaliadas antes de após calcinação à 500ºC por 2 horas sendo também avaliada a resistência a corrosão após imersão em solução SBF para incorporação de cálcio e fósforo. Os autores verificaram que as amostras anodizadas e calcidadas exibiram resultados de resistência à corrosão mais satisfatórios quando comparadas ao Ti-CP, e as amostras anodizadas porém não calcinadas. Dessa forma, a calcinação após a oxidação anódica promove uma estabilidade eletroquímica essencial para a aplicação em implantes.

A variação da temperatura de calcinação e conseqüentemente as fases do TiO_2obtidas podem ou não afetar a resistência à corrosão de acordo com o substrato.

Para o Ti-CP, (BAI et al., 2008) verificaram melhor resposta para as amostras calcinadas a 450ºC por 2 horas comparadas às amostras calcinadas a 600ºC e 750ºC.

De acordo com RAFIEERAD et al., (2015) a resistência à corrosão em amostras anodizadas será diretamente afetada pelo eletrólito uma vez que as dimensões dos nanotubos de TiO_2 serão afetadas por ele. Essa afirmação justifica a divergência encontrada entre os estudos realizados para a liga Ti6Al7Nb, MAZARÉ et al., (2014) encontraram valores superiores para as amostras da liga Ti6Al7Nb anodizadas a 550ºC em eletrólito formado por 60% glicerol/40% H_2O + 0,5% para NH_4F. Por outro lado, quando solução de etilenoglicol e fluoreto de sódio (NaF 90: EG 10) foi empregada a melhor condição foi observada para calcinação à 450ºC.

2.7 A ATIVIDADE BACTERICIDA DOS NANOTUBOS DE TiO2 E A INCORPORAÇÃO DA CLOREXIDINA

As infecções bacterianas iniciadas em dispositivos médicos implantados no corpo humano são atualmente consideradas um problema pela sua complexidade em ser combatido, pois estas formam um biofilme resistente a ação de antibióticos tradicionais (ERCAN et al., 2011). Em um estudo que avalia o controle do crescimento dos nanotubos de TiO_2 para diâmetros de 20-80 nm verificou-se que há uma relação entre os diâmetros e fases que alteram significativamente as respostas das bactérias Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*) e Staphylococcus aureus (S. *aureus*) sobre a superfície do material. (KIM et al,. 2013) fala que independentemente da técnica de esterilização utilizada, camadas de nanotubos de menor diâmetro (20 nm) são melhores na redução do crescimento de bactérias. Embora o diâmetro dos nanotubos possa influenciar no controle e combate contra bactérias causadores de infecções na superfície dos implantes, ainda assim é necessário a utilização de drogas para que o controle ocorra de uma forma mais eficiente e eficaz. KULKARNI et al., (2015) discute a possibilidade de melhorar as propriedades de biocompatibilidade de próteses de titânio para aplicações ortopédicas, revestindo as estruturas nanotubulares com drogas redutoras de infecção, como penicilina que é um agente estreptomicina, além de drogas que combatem a inflamação, como a dexametasona.

Da mesma forma Barbour e seus colaboradores estudaram a incorporação da clorexidina na superfície do TiO2, e verificaram que as fases cristalinas do material influenciam na incorporação desta droga. Superfícies formadas pela fase cristalina anatase são mais susceptíveis à incorporação da clorexidina que superfícies contendo a fase cristalina rutilo e a taxa de morte das bactérias aumenta em torno de 80% após a incorporação de clorexidina se comparada com a mesma superfície não incorporada.

A clorexidina é um agente antimicrobiado muito utilizado na área odontológica e sendo estudado desde 1954 por apresentar uma série de vantagens para tal aplicação, como por exemplo, elevada ação antimicrobacteriana com uma ação efetiva contra uma ampla variedade de microorganismos gram-positivos e gram-negativos, além de inibir a ação de fungos e enzimas. Ela é empregada na Odontologia em diversos produtos de higiene bucal como enxaguatórios, cremes dentais, além de agentes microbianos de uso tópico (CORTIZO et al. 2012).

O sucesso da utilização da clorexidina está relacionado com a sua persistência na atividade antibactericida em meio bucal, ou seja, absorção e liberação conhecida como "substantividade" conforme relatado por (KOZLOVSKY et al. 2006). Neste estudo, foi analisada a ação bactericida durante a liberação e persistência da ação da solução 0,2% e 0,1% de clorexidina no intervalo de 24 horas na superfície amostras em forma de discos de titânio recobertas com saliva. A clorexidina se mostrou se eficiente na ação como agente anti-placa, bactericida além de se mostrar ativa durante todo o intervalo de tempo estudo, sendo liberado gradualmente por difusão e mantendo o meio livre do surgimento e proliferação de bactérias, fungos e organismos nocivos ao meio (ORSINI et al., 2000).

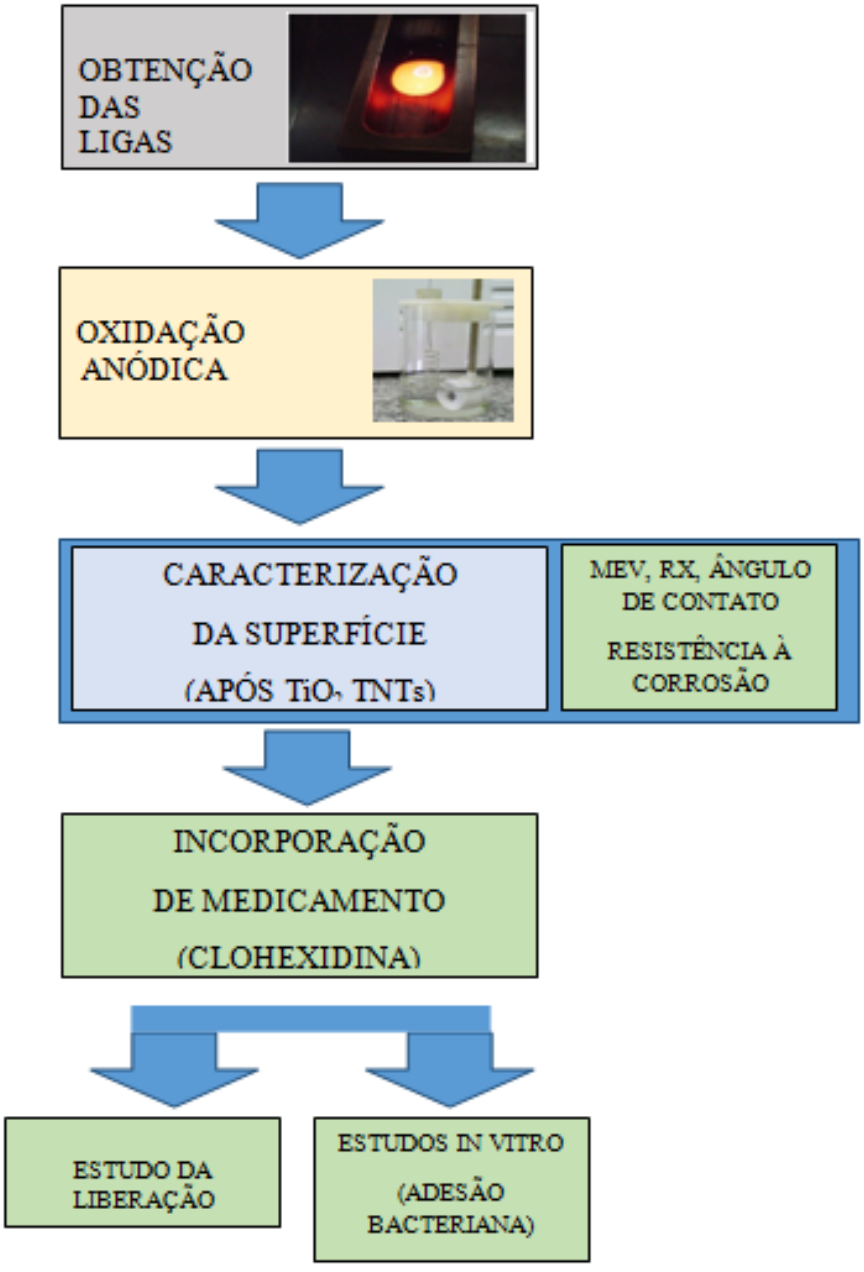
Os estudos do comportamento da liberação da clorexidina foram analisados por meio de ensaios de Espectroscopia do UV visível em placas de 10x10x1 mm de titânio comercialmente puro anodizads (KIM et al., 2008). Foi analisada a liberação da clorexidina durante o intervalo de 14 dias e os efeitos da liberação em implantes dentários tiveram sucesso no controle contra a infestação de bactérias e fungos.

A análise de trabalhos encontrados na literatura leva a crer que existem inúmeras pesquisas buscando associar a modificação de superfície a incorporação de medicamentos em materiais metálicos com propriedades de superfície e volume para tais aplicações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Na figura 10 está o fluxograma que detalha a metodologia utilizada para o desenvolvimento do presente trabalho.

Figura 10 – Fluxograma da metodologia empregada neste trabalho



Fonte: autor

3.1 OBTENÇÃO DA LIGA

Os lingotes da liga Ti-7,5Mo que deram origem aos corpos de prova utilizados nesse trabalho foram obtidos a partir de titânio comercialmente puro e molibdênio 99,99% na forma de chapas (figura 11). Antes da pesagem, as chapas foram cortadas e limpas por meio de decapagem química, utilizando uma solução, formada por HCl e HNO_3 (na proporção de 1:3). Os materiais foram então pesados separadamente em balança analítica de acordo com a composição da liga Ti-7,5Mo.

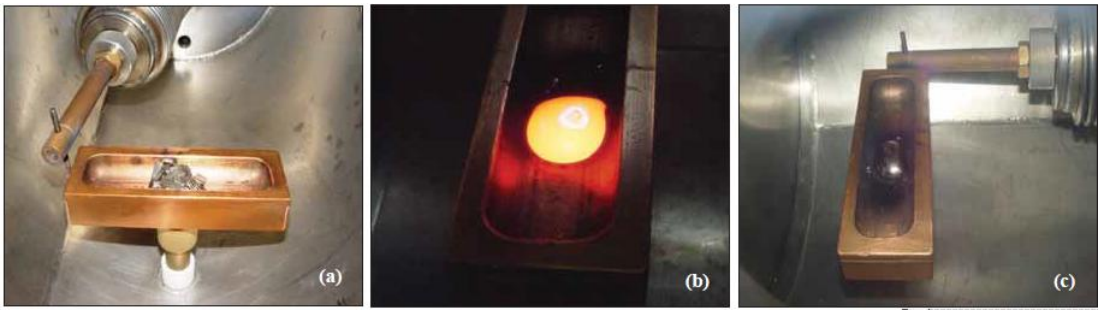
Figura 11 – (a) Titânio e (b) Molibdênio utilizado no processo de fundição e processamento da liga

Fonte - Autor

A fusão foi realizada em um forno a arco voltaico, com cadinho de cobre refrigerado àgua onde os materiais foram dispostos por ordem de densidade, ou seja, o mais denso (Mo – 10,22 g/cm^3) sobre o menos denso (Ti – 4,55 g/cm^3). Com a câmara fechada, foi feito o processo de purga, que consiste na manutenção do vácuo por 30, 25, 15 e 10 minutos para a retirada de elementos químicos presentes no ar atmosférico, seguido da injeção e retirada de argônio, repetindo o processo por 6 vezes, sendo o argônio mantido na sétima etapa. Os lingotes foram pesados em balança analítica após a fusão para confirmar que não houve perda de massa. O processo de fusão se deu pela passagem de corrente elétrica entre o eletrodo inerte de tungstênio e o cadinho de cobre refrigerado à água. Durante o processo de fusão foi feita a movimentação linear do eletrodo inerte de tungstênio para realizar a fusão de todo o material no cadinho. Após cada passe do eletrodo, com o arco fechado, a amostra foi rotacionada em 180° por pelo

menos 10 vezes para garantir a homogeneidade da liga. A seqüência para a fabricação dos lingotes pode ser visualizada na figura 12.

Figura 12 – Sequência para produção do lingote: (a) Materia prima para obtenção da liga; (b) Fusão; (c) Resfriamento e obtenção do lingote.



Fonte: (ESCADA 2012)

3.2 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

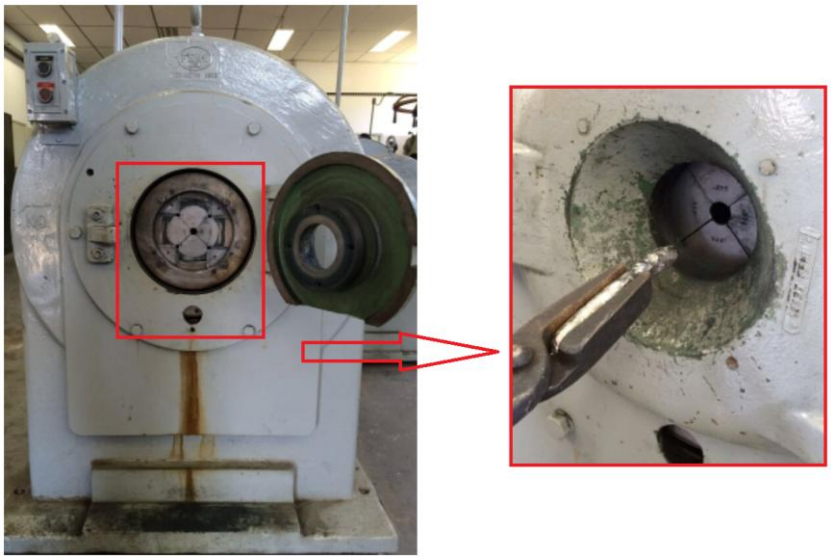
Após a fusão, os lingotes foram submetidos a tratamento térmico de homogeneização em forno tubular, para garantir a homogeneidade da estrutura do lingote e estabilizar a fase mais suscetível à deformação mecânica. O lingote foi colocado em cadinho de alumina e ambos inseridos em tubo de quartzo do forno tubular e foi iniciado o processo de purga, mantendo o vácuo durante todo o tempo do tratamento térmico. O forno foi aquecido à temperatura de 1100°C sob a taxa de aquecimento de 15°C/min, atingida a temperatura final, o sistema foi mantido a essa temperatura por 1440 minutos (24 horas) e ao término desse período de tempo, o forno foi desligado e o resfriamento dos lingotes ocorreu juntamente com o resfriamento natural do forno. Todo o processo foi realizado no Departamento de Materiais e Tecnologia (DMT) da UNESP – Campus de Guaratinguetá, com o forno tubular de atmosfera controlada como mostra a Figura 13.

Figura 13 – Forno tubular de atmosfera controlada

Fonte: autor

Para obtenção dos tarugos, foi empregado o forjamento rotativo a frio (swaging) realizado no Instituto Tecnológico Aeroespacial ITA. O equipamento utilizado foi o FENN, com potência de aproximadamente 30 cv (HP) e velocidade de 1700 rpm. O tarugo foi aquecido à 1000 ºC antes de iniciar o processo e antes de cada passe, o tarugo foi deixado no forno a 1000 ºC por 10 minutos. Feita a troca de matrizes (martelos), resultando em uma redução do diâmetro na ordem de 20% do valor anteriores ao passe, correspondendo a 8 mm de diâmetro como mostra a Figura 14.

Figura 14 – Equipamento para forjamento rotativo a frio FENN modelo 3F.



Fonte: Autor

Após o forjamento e obtenção das hastes no diâmetro desejado, estas foram seccionadas na máquina de corte fino (Isomet 4000, Buehler), onde foram obtidas as amostras em forma de discos com diâmetro de 8mm e 3mm de espessura. Para o corte foi utilizado disco de diamante e solução 1:1 de fluido para corte e água.

3.3 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE

3.3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Antes da modificação da superfície por anodização, as amostras foram preparadas passando respectivamente pelas seguintes etapas:

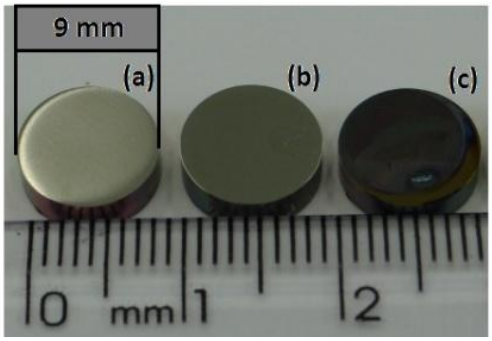
a) Lixamento úmido na ordem da numeração das lixas 400, 600, 1000, 1200 e 1500. A decisão de iniciar o processo na lixa 400 se deu devido ao bom acabamento na superfície da amostra gerado pelo corte.

b) Polimento com solução A (1:1 água e sílica coloidal) + Ácido Oxálico (5%). Foi utilizada a solução A + ácido oxálico na proporção 1:1. Foi utilizada a politriz com pano de polimento OP Chem.

Após o lixamento seguido do processo de polimento, as amostras foram submetidas ao banho de ultrassom. No banho de ultrasson as amostras foram primeiramente imersas em água deionizada e sabão neutro, em seguida, imersas em água deionizada e finalizando o processo de limpeza, imersas em Etanol 98%. Cada uma das etapas durou 20 minutos.

As amostras foram mantidas no dessecador à temperatura ambiente fechadas a vácuo de 400 mmHg. A Figura 15 ilustra a aparência das amostras respectivamente após o processo de lixamento, polimento e anodização.

Figura 15 – Amostras de 9 mm utilizadas nos ensaios (a) Amostra lixada; (b) Amostra polida; (c) Amostra anodizada e calcinada.



Fonte: Autor

3.3.2 OXIDAÇÃO ANÓDICA

O processo de anodização foi realizado utilizando o eletrólito contendo glicerol e NH_4F 0,25% por 24 horas variando o potencial de anodização em 10 V e 20 V. No quadro 10 é possível observar os grupos anodizados de acordo com o potencial de anodização.

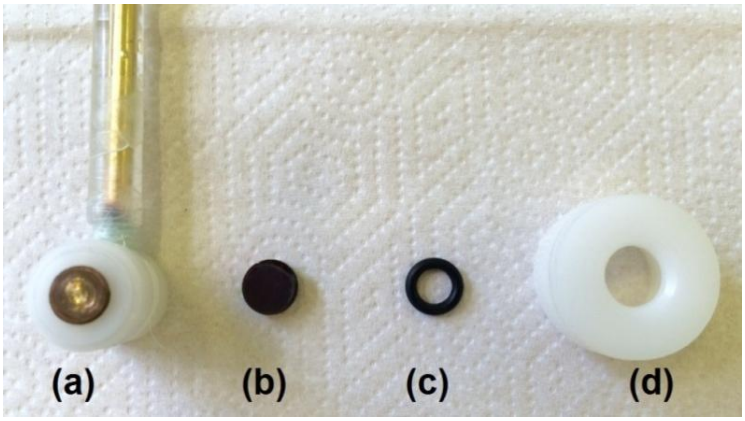
Quadro 10: Divisão dos grupos de acordo com o potencial de anodização

Potencial de Anodização (V)	Tempo (h)	Temperatura de Calcinação (Cº)
10	24	450
20	24	450

Fonte: autor

Para realizar o processo de anodização foram confeccionados porta amostras de teflon capazes de vedar as amostras com o auxílio de um anel de borracha colocado ao redor da amostra que é introduzida dentro do porta amostras como ilustra a seqüência do processo na figura 16.

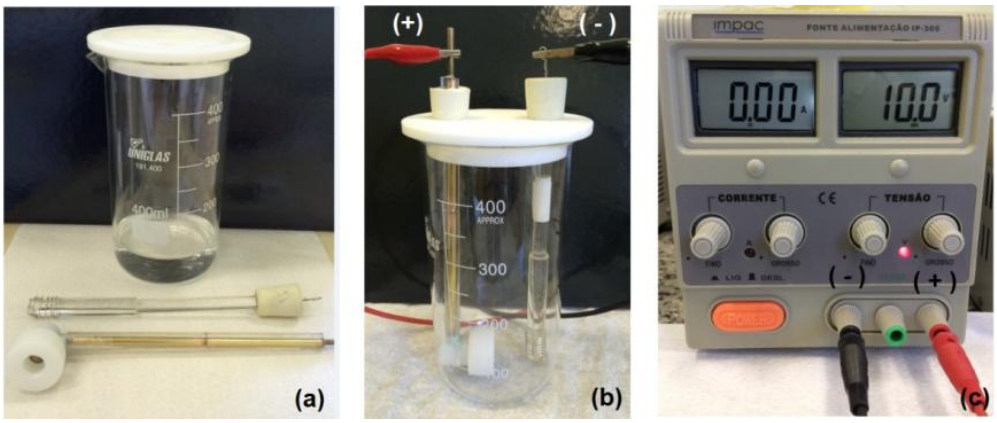
Figura 16 – Etapas para adaptação da amostra (a) porta amostra, (b) amostra, (c) borracha de vedação e (d) tampa do porta amostra .



Fonte: Autor

Na figura 17 podemos observar as partes que compõem a célula eletroquímica, com as amostras adaptadas no porta amostras.

Figura 17 – Montagem da célula eletroquímica (a) Recipiente de vidro com eletrólito e porta amostra e contra-eletrodo, (b) célula eletroquímica montada, (c) fonte de alimentação.



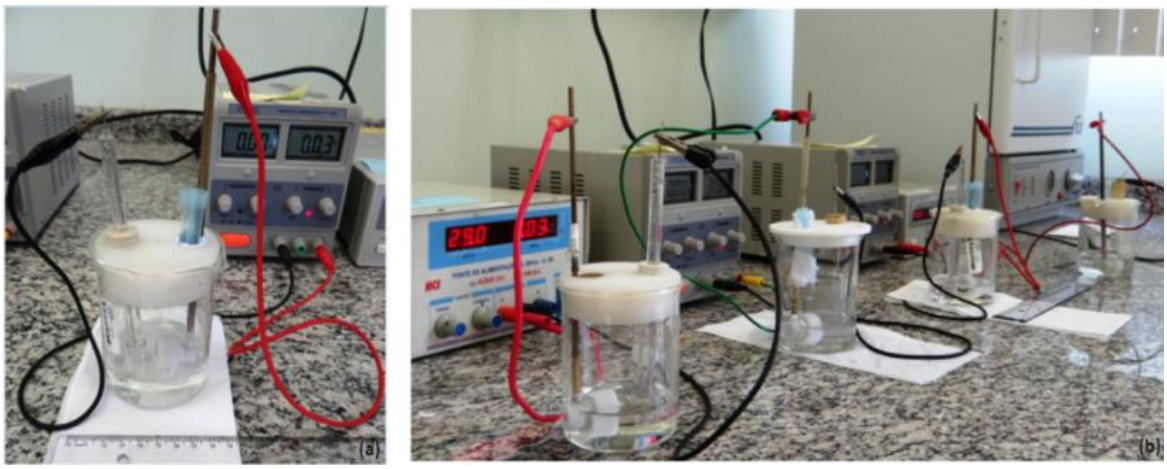
Fonte: Autor

O porta amostra contendo a amostra foi conectado a uma fonte de alimentação (anodo +) e o contra-eletrodo/auxiliar de platina (catodo -). Estas por sua vez foram imersas a um meio eletrolítico contendo 80 ml glicerol e NH_4F 0,25% de massa.

Montada a célula e definida a condição de 10 V, foi aplicada a taxa de 1 V/min e a partir daí contado 24 horas para anodização completa em 10 V.

Para a condição de 20 V, o mesmo procedimento foi utilizado e foi aplicada a taxa de 1 V/min e a partir daí contado 24 horas para anodização completa em 20 V. Após o término da anodização, as amostras foram submetidas ao banho de ultrassom com água deionizada por 7 minutos e em seguida calcinadas. A Figura 18 mostra a célula eletroquímica durante o processo de anodização.

Figura 18 – (a) Célula montada para anodização; (b) Conjunto de células trabalhando simultaneamente na produção de amostras anodizadas.



Fonte: Autor

O processo de calcinação a 450 ºC seguiu os seguintes parâmetros: taxa de aquecimento 5ºC por minuto, tempo de permanência de 60 minutos e resfriamento no interior do forno, como mostra a figura 19.

Figura 19 - Forno Mufla EDG com aquecimento por resistência elétrica usado para processo de calcinação; (b) Interior do forno.

Autor: Fonte

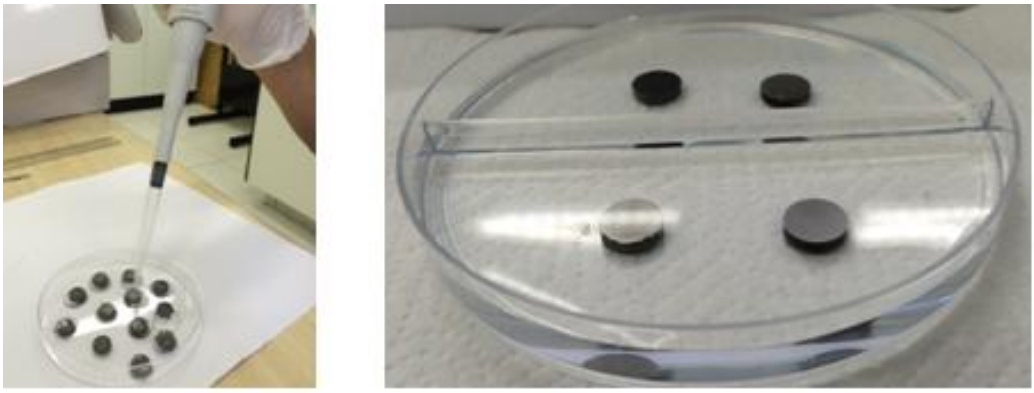
3.3.3 ESTERILIZAÇÃO

Antes da incorporação da clorexidina as amostras foram esterilizadas com dose de 25 kGy, na fonte de Cobalto-60, irradiação gamma, com taxa de dose de 0,883 kGy/h com o tempo de 28,3h. A fonte usada foi a gammacell – modelo: 220 – número de série: 142 do fabricante Atomic Energy of Canada Limited. A esterilização foi feita no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Centro de Tecnologia das Radiações IPEN/CTR.

3.3.4 INCORPORAÇÃO DA CLOREXIDINA

Na etapa de incorporação da clorexidina, as amostras foram imersas em clorexidina na placa de Petri à temperatura ambiente por 30 minutos (figura 20). Após esse procedimento as amostras foram guardadas no dissecador em temperatura ambiente sob vácuo de 400 mmHg. A clorexidina utilizada no processo foi manipulada pelo laboratório Pharmaexpress na concentração de 2% diluído em solução de SBF.

Figura 20 – Incorporação da clorexidina por imersão.



Fonte: Autor

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

3.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) e ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

Para avaliar a morfologia da superfície das amostras foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura da Zeiss Evo LS- 15 do Laboratório de Imagens no Departamento de Materiais e Tecnologia da UNESP - Campus de Guaratinguetá. Foi usado o modo de pressão estendida (EP), onde a pressão interna da câmara é ajustada de acordo com cada tipo de amostra, entre 30 e 100 Pa. O gás utilizado na câmara foi nitrogênio com grau 5.0 (pureza de 99,999%).

Foram amostrados sinais de elétrons retroespalhados (BSE) utilizando o detector Zeiss 4Q-BSD, semicondutor de quatro quadrantes e o de elétrons retroespalhados, usando o detector Zeiss VPSE-G3, específico para pressões até 400 Pa que coleta fótons gerados pela quebra de moléculas de N_2 por elétrons secundários que emergem da amostra.

Figura 21 – Microscópio Eletrônico de Varredura MEV.

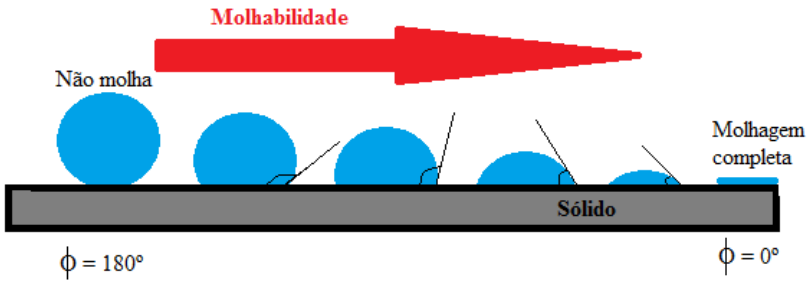
Fonte: Autor

O ensaio de microanálise por energia dispersiva foi realizado com o mesmo equipamento para identificar os picos dos elementos contidos na camada de óxido de TiO_2. Foi utilizado o detector de microanálise por energia dispersiva de raios-X Inca x-act da Oxford Instruments montado no microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO LS-15 e controlado pelo sistema Inca Energy 250.

3.4.2 ÂNGULO DE CONTATO

Estudos de ângulo de contato foram realizados no Laboratório de Materiais e Tecnologia da UNESP - Campus de Guaratinguetá com o instrumento Drop Shape Analyzer DSA100 - KRÜSS GmbH, com capacidade de medir a tensão superficial de liquidos, molhabilidade e interação interface líquido e substrato. O equipamento mede ângulo de contato entre 1º - 180º como ilustra o esquema na figura 22, e registra imagens com câmera de zoom de 7x e câmera com resolução de 780 × 580 px, como mostra a figura 23.

Figura 22 – Esquema da medida do ângulo de contato sobre uma superfície metálica



Fonte: Autor

Figura 23 - Análise do ângulo de contato.

Fonte: Autor

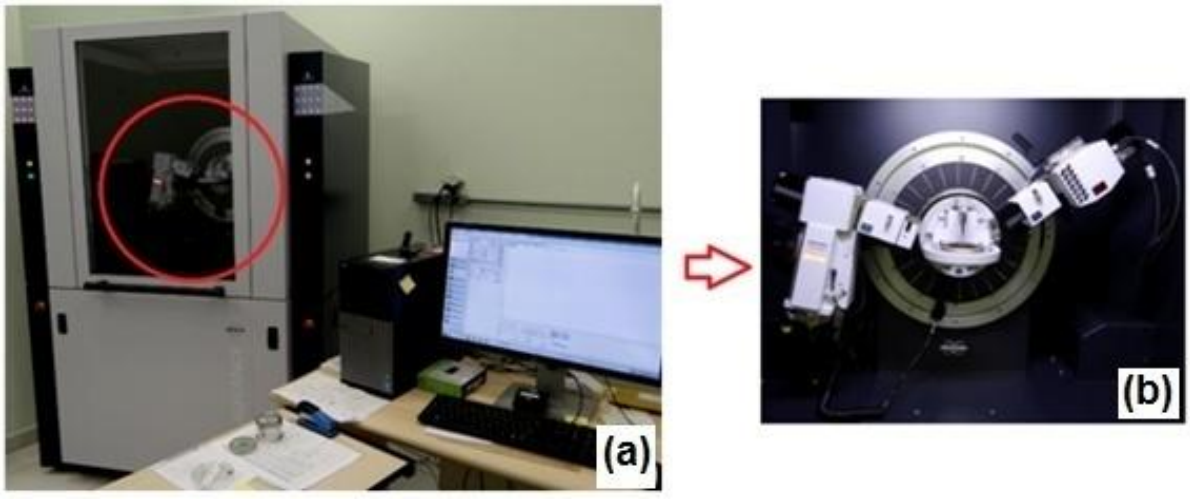
A câmera captura a imagem da gota sendo depositada sobre a amostra através de uma seringa de vidro. O perfil dessa gota é analisado por um programa de computador que calcula o ângulo de contado entre a gota e a superfície. Para ângulo menor que 90º diz-se que a superfície possui característica hidrofílica. Essa propriedade é denominada molhabilidade do material e está ligada com a energia de superfície do mesmo.

3.4.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Este método faz uso dos raios-X de comprimento de onda conhecidos para determinar os espalhamentos dos planos cristalinos desconhecidos, ou seja, este caracteriza qualitativamente (no caso deste trabalho) a presença de fases cristalinas no matérial analisado. Os raios X são ondas eletromagnéticas de alta energia e pequeno comprimento de onda. Quando o feixe de raios-X atinge os átomos do material analisado, seus elétrons são acelerados e passam a reemitir radiação com a mesma energia (mesmo comprimento de onda), porém em todas as direções. Se os átomos estiverem num tipo de arranjo periódico, as ondas sofrerão interferência, ou seja, ocorre uma flexão apenas em certos ângulos de incidência e reflexão identificando então a presença de fases cristalinas.

Esta técnica permite que o feixe de raios X interaja com finas camadas de material que podem ser de alguns nanômetros ou poucos micrômetros. As análises foram feitas no laboratório do Departamento de Materiais e Tecnologia da UNESP - Campus de Guaratinguetá com o equipamento Bruke D8 ADVANCE com DAVINCI Figura 24, em 2θ baixo ângulo.

Figura 24 - (a) Equipamento completo de difração de raios X e (b) aproximação do canhão e suporte de amostras

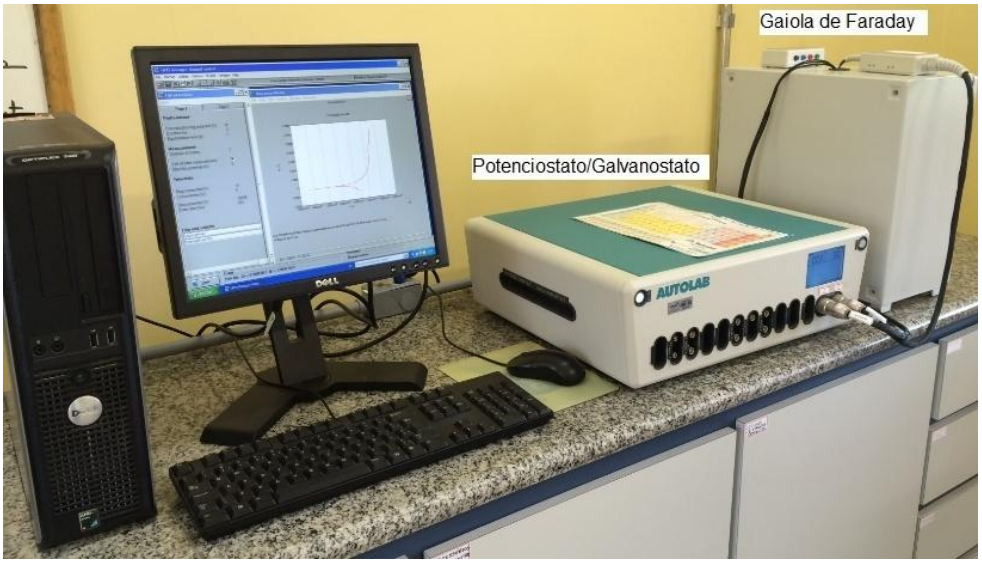


Fonte: Autor

3.4.4 ENSAIO ELETROQUÍMICO DE RESISTÊNCIA A CORROSÃO

Os ensaio de corrosão foram realizados na FATEC – Pindamonhangaba com o equipamento Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB 302N.FRA.V com o auxílio dos softwares GPeS para medidas de potencial de circuito aberto e curva de polarização e Fra para obter os dados e curva da impedância como mostra a figura 25.

Figura 25 – Potenciostato/Galvanostato e gaiola de Faraday

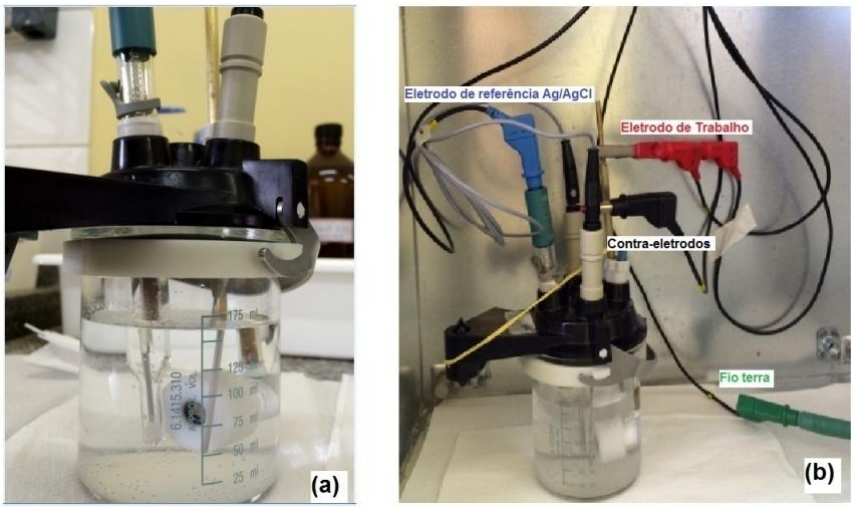


Fonte: Autor

O ensaio foi dividido em 3 grupos e realizado 3 vezes para cada grupo. O primeiro grupo continha as amostras anodizadas em 10 V, o segundo as anodizadas em 20 V e o terceiro grupo as amostras com superfície tratada até a lixa 1500. A área da superfície exposta ao ataque durante o ensaio foi de 0,2827 mm^2, ou seja, um circulo de 6 mm de diâmetro.

Para cada ensaio foi utilizado 125 ml de solução de SBF (fluido corporal simulado) à temperatura inicial de 25,5ºC, 1 eletrodo de trabalho WE, 2 contra-eletrodos de platina e 1 eletrodo de referência Ag/AgCl. A célula foi montada como mostra a figura 26.

Figura 26 – Célula de corrosão (a) montagem e (b) disposição na gaiola de Faraday.



Fonte: Autor

Num único ensaio foi possível obter dados de potencial de circuito aberto (tempo aproximado de 3 horas), dados da impedância (tempo aproximado de 1 hora e 30 minutos) e dados para curva de polarização (tempo aproximado de 1 hora).

3.5 CULTURA DE BACTÉRIA

3.5.1 O MICROORGANISMO

Duas estirpes de referência [American Type Culture Collection (ATCC), Candida albicans (ATCC 18804) e Staphylococcus aureus (ATCC 6538)] foram usadas no estudo. suspensões padrão de cada linhagem com densidades ópticas equivalentes a 106 células / mL foram preparados. Para esta finalidade, as estirpes foram cultivadas em meio de Sabouraud (Difco, Detroit, EUA) para C. albicans ou infusão de cérebro e coração (BHI) agar (Difco, Detroit, EUA) para S. aureus e incubou-se à 37 ° C durante 24 h . Após a incubação, as células foram ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, 0,1 M, pH 7,2), e o número de células na suspensão foi contada num espectrofotómetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil). Os parâmetros de densidade e comprimento de onda ópticos utilizados foram 0,284 e 530 nm para C. albicans; e 0,374 e 490 nm para S. aureus.

3.5.2 O BIOFILME

A formação de biofilme foi desenvolvido como proposto por PEREIRA et al., (2011), com algumas modificações. Os biofilmes foram cultivadas em discos de 8 mm de diâmetro e 3 de espessura. Esse processo foi dividido por grupos: Grupo 1, anodizados em 10 V seguidos de calcinação e incorporação da clorexidina; Grupo 2, anodizados em 20 V seguidos de calcinação e incorporação da clorexidina além dos grupos controle para 10 V e 20 V anodizadas e calcinadas. Foram utilizadas 12 amostras de cada grupo, num total de amostras 48 amostras.

Os discos foram colocados em placas de 24 poços (Costar Corning, Nova Iorque, EUA), contendo 2 ml de infusão de cérebro e coração estéril (BHI) (Difco, Detroit, EUA) suplementado com 5% de sacarose e inoculados com 0,1 ml de cada suspensão microbiana. Os discos foram então incubadas a 37 ° C durante 48 h. A mídia não foi alterado durante o período de incubação.

Após 48 h de incubação, os discos com os biofilmes foram assepticamente lavadas duas vezes com 2 ml de PBS para remover o material fracamente ligado.

Os discos foram colocados em tubos contendo 10 mL PBS e sonicados (50 W, Sonics Vibra Cell, Connecticut, EUA) durante 30 segundos para dispersar os biofilmes. Biofilmes suspensões foram diluídas em série em PBS para dar diluições de 10-1 a 10-8 vezes a concentração original. Alíquotas de cem microlitros de cada diluição foram semeadas em agar (em duplicado): agar de dextrose de Sabouraud com 50 mg / L de cloranfenicol (UniãoQuímica, São Paulo, Brasil) para C. albicans, e ágar Manitol (Difco, Detroit, EUA) a S . aureus. Após 48 horas de incubação, foi determinado o número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC / mL). Os resultados foram log-transformados (log 10) e analisados por análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado para indicar uma diferença estatisticamente significativa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DA SUPERFÍCIE

Nas figuras 27 e 28 é possível observar as imagens de topo da superfície das amostras obtidas após anodização com potencial de 10 V e 20 V respectivamente, após o tratamento térmico de calcinação.

Para os dois valores de tensão aplicados se observa a formação de uma superfície homogênea contendo nanotubos de TiO_2 em toda a sua extensão e com ausência de trincas. Com o auxílio do programa de tratamento de imagens ImageJ, foi possível estimar o diâmetro interno (Di), externo (De), espessura da parede e o comprimento médio dos nanotubos como mostra o quadro 11.

Quadro 11 – Valores médios dos nanotubos obtidos pelo programa ImageJ.

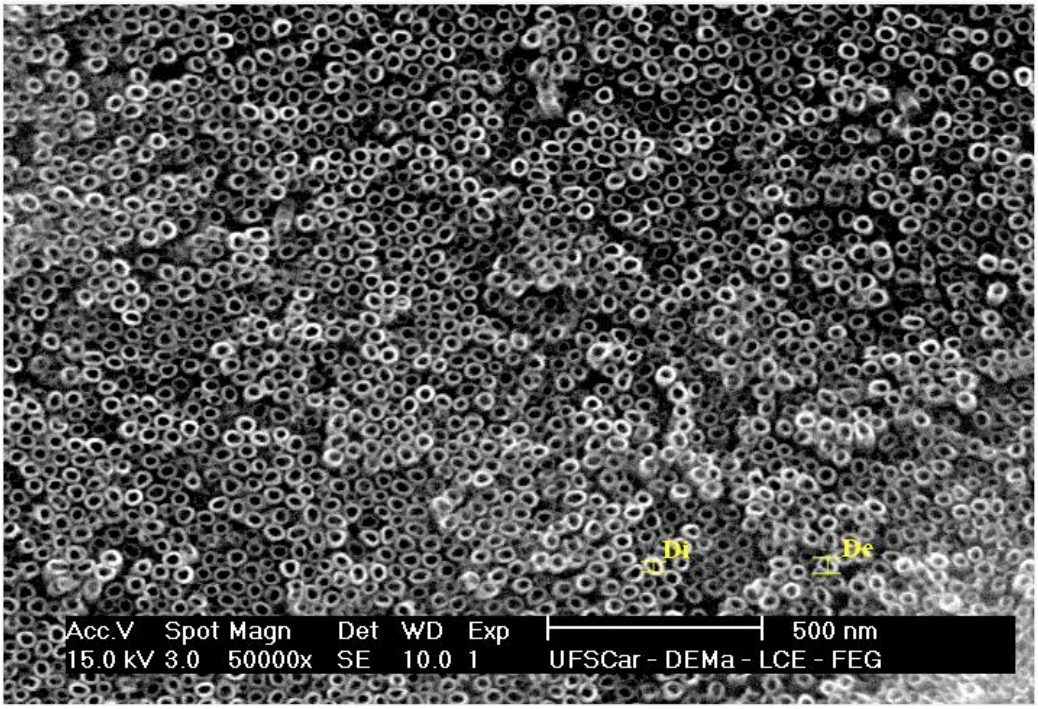
Potencial (V)	Di (nm)	De (nm)	Espessura (nm)	Comprimento (nm)
10	26,656	42,489	7,866	153,95
20	31,427	54,916	11,744	257,43

Fonte: Autor

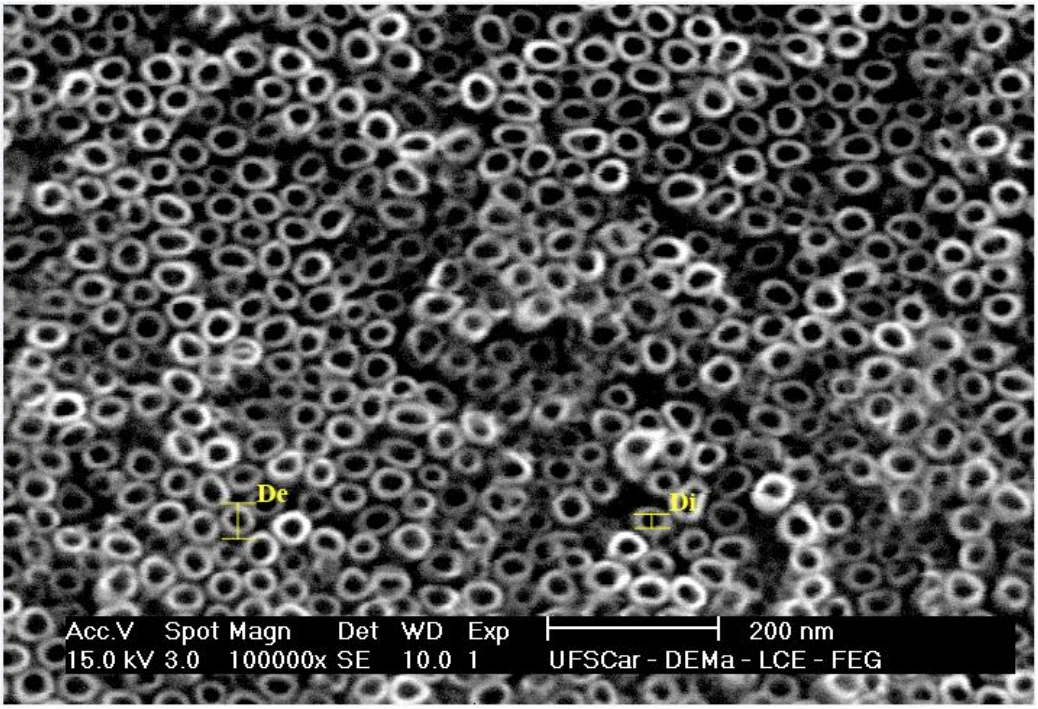
Analisando os valores distribuídos no quadro 10, vemos que os valores obtidos na média dos diâmetros interno e externos dos nanotubos aumentam com o aumento do potencial aplicado, ou seja, existe uma relação linear entre o potencial aplicado e o comprimento dos nanotubos obtidos como afirma Valota. Em comparação com os valores encontrados por Regonini na tabela 10, vemos que os diâmetros estão dentro da faixa discriminada por ele no gráfico Potencial X Diâmetro.

A superfície anodizada em 10 V tem um maior número de nanotubos se comparada com a superfície anodizada em 20 V, o que leva a afirmar, segundo estudos realizados por Kulkami que a superfície anodizada em 10 V tem um potencial eletrostático mais intenso (carregado negativamente) que a superfície anodizada em 20 V.

Figura 27 – Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV- FEG) da liga Ti-7,5Mo para as amostras: Anodizadas a 10V durante 24 horas e calcinadas a 450 °C (a) menor (b) maior aumento.



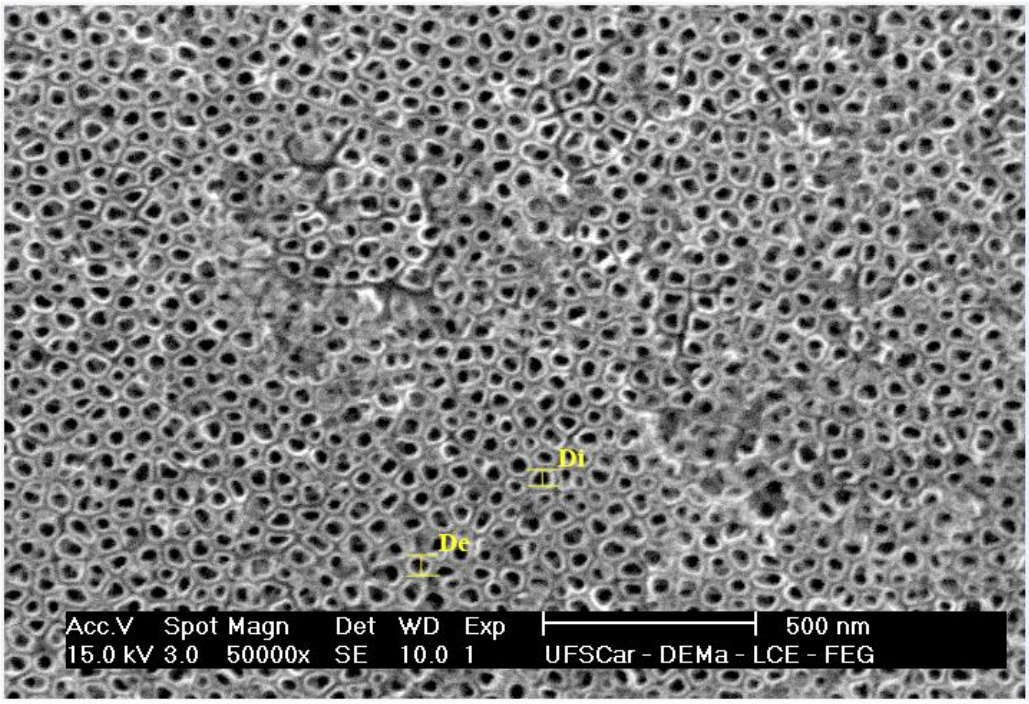
(a)



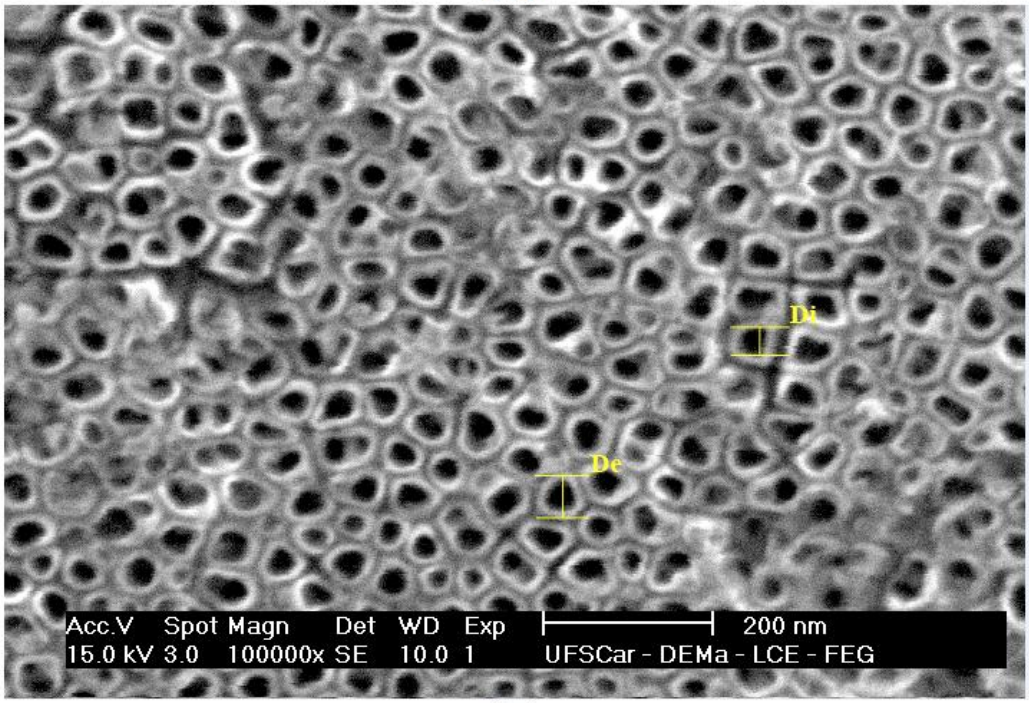
(b)

Fonte: Autor

Figura 28 – Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV- FEG) da liga Ti-7,5Mo para as amostras: Anodizadas a 20V durante 24 horas e calcinadas a 450 °C (a) menor (b) maior aumento;



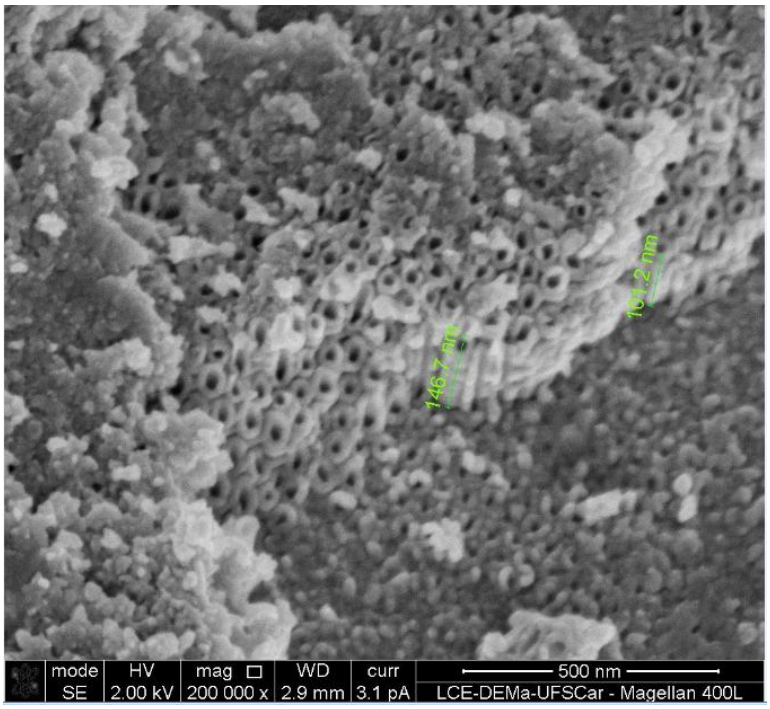
(a)



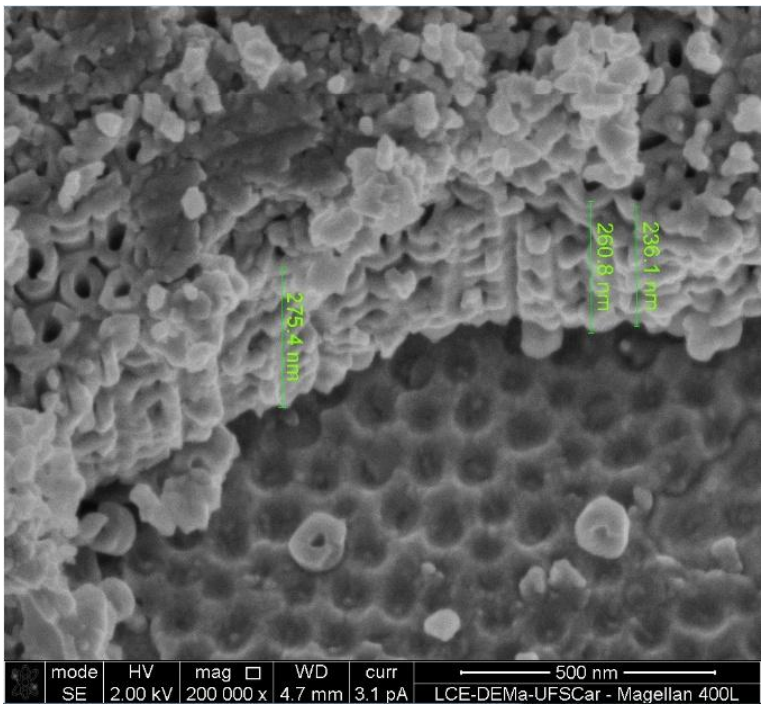
(b)

Fonte: Autor

Figura 29 – Imagens do comprimento dos nanotubos na superfície da liga Ti-7,5Mo (a) anodizados a 10 V e (b) anodizados em 20 V. Obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV- FEG).



(a)



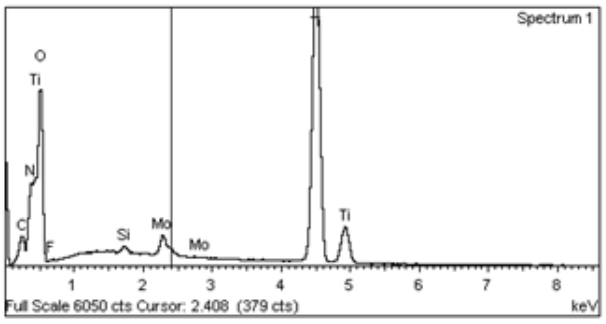
(b)

Fonte: Autor

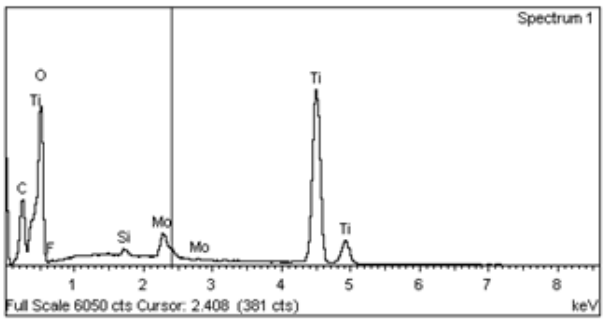
A análise por EDS da superfície mostrou traços de flúor resultantes do eletrólito empregado na anodização (glicerol, água e fluoreto de amônio) além de titânio, oxigênio e molibdênio (elementos da liga e óxido formados) conforme observado na Figura 30. Não é possível afirmar através da análise EDS se o elemento molibdênio encontrado é proveniente do substrato ou do óxido, visto que o feixe de penetração atinge camadas mais profundas, atingindo também o substrato. Para observar a camada superficial do óxido e os elementos nela contidos, seria necessária a caracterização por XPS. Resultados obtidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UNESP – Campus de Guaratinguetá por meio da caracterização EDS mostram que não há presença de molibidênio no óxido de amostras anodizadas em 20 V e calcinadas, entretanto, não há informações para as amostras anodizadas em 10 V e calcinadas.

A presença do elemento flúor na camada de nanotubos de TiO_2 também foi verificada em outros trabalhos (SUL et al 2002; LAUSMAA et al., 2001) no entanto sua influência na adesão celular ainda é contestada.

Figura 30: Análise EDS (a) Espectro dos elementos encontrados em 10 V; (b) Espectro dos elementos encontrados em 20 V.



(a)

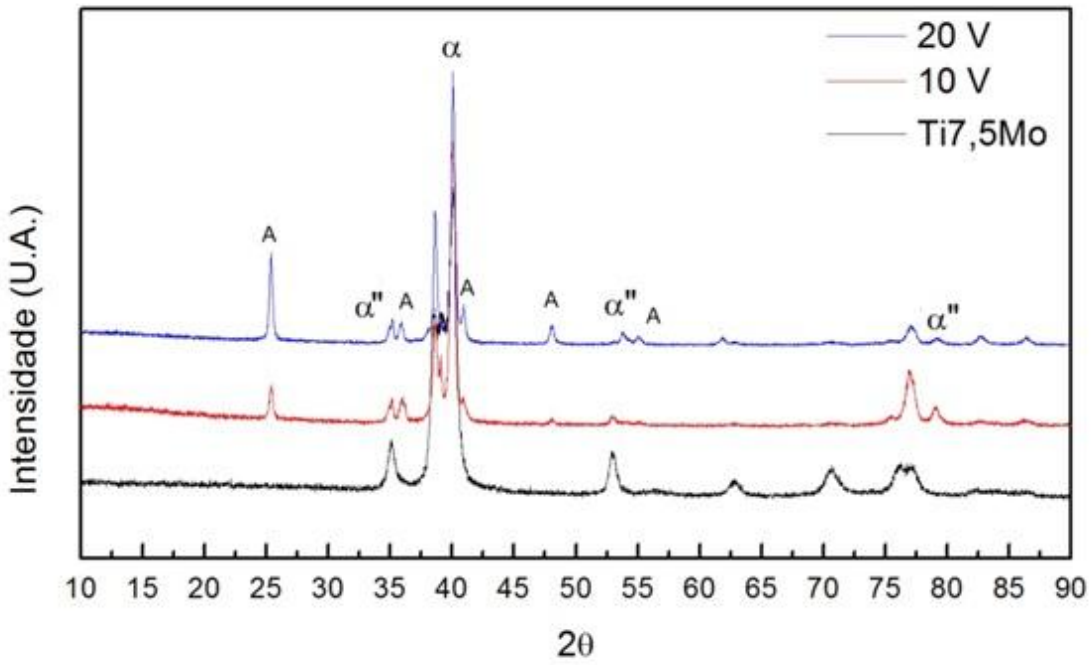


(b)

Fonte: autor

A figura 31 mostra os difatogramas de raios-X da superfície da liga Ti-7,5Mo contendo nanotubos de TiO_2 formados nos potenciais de 10 V e 20 V e calcinadas a 450 °C comparados com a liga de Ti-7,5Mo. Da mesma forma que (CHAVEZ et al., 2016) foi verificada a formação da fase anatase e ausência da fase rutilo para todas as amostras sob a mesma condição, alterando apenas o potencial de anodização. Estudos relatam que a presença da fase anatase na superfície modificada contribui para uma melhor adesão celular (FANG et al., 2011).

Figura 31 – Difratogramas de raios-X da liga sem o tratamento de anodização e para as amostras anodizadas em 10 V e 20 V.



Fonte: Autor

4.2 ÂNGULO DE CONTATO

Ensaios para medir o ângulo de contato foram feitos para avaliar o potencial hidrofílico proporcionado pela superfície do filme de nanotubos de dióxido de titânio. O potencial hidrofílico ou hidrofilicidade é um parâmetro importante para os biomaterias. PARK et al., (2003) encontraram uma relação entre o diâmetro dos nanotubos de

titânio e a hidrofilicidade e constataram que hidrofilicidade aumenta com o aumento do diâmetro do nanotubo de TiO_2. KABASO e GONGADZE (2011) estudaram a distribuição de cargas sobre a superfície dos nanotubos de TiO_2 e verificaram que em superfícies com maior número de nanotubos por área (nanotubos de menor diâmetro) existe uma maior densidade de cargas negativas se comparada com uma superfície com menor número de nanotubo por área (nanotubos de maior diâmetro). Logo, a hidrofilicidade pode estar relacionada como as forças eletrostáticas de repulsão sobre a superfície da matriz de nanotubos.

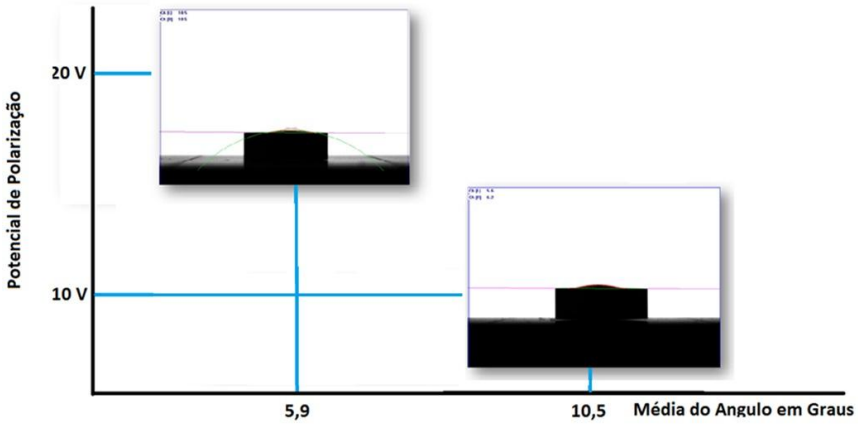
O quadro 12 que mostra os valores dos ângulos de contato aferidos para as amostras anodizadas a 10 V e 20 V e a figura 32 mostra o espalhamento da gota sobre a superfície da amostra, podemos dizer que o potencial hidrofílico aumenta quando o ângulo de contato diminui, pois mostra a gota melhor espalhada sobre a superfície e esse espalhamento pode estar relacionado com a distribuição de cargas eletrostáticas sobre a superfície do material.

Quadro 12: Quadro comparativo

Potencial aplicado	Número de TNT por área	Densidade de Carga eletrostática	Ângulo de contato	Potencial Hidrofílico
10 V	Maior	Maior	Maior	Menor
20 V	Menor	Menor	Menor	Maior

Fonte: Autor

Figura 32 - Imagem do ensaio para medida do ângulo de contato: (a) Amostra anodizada em 10V; (b) Amostra anodizada em 20V.

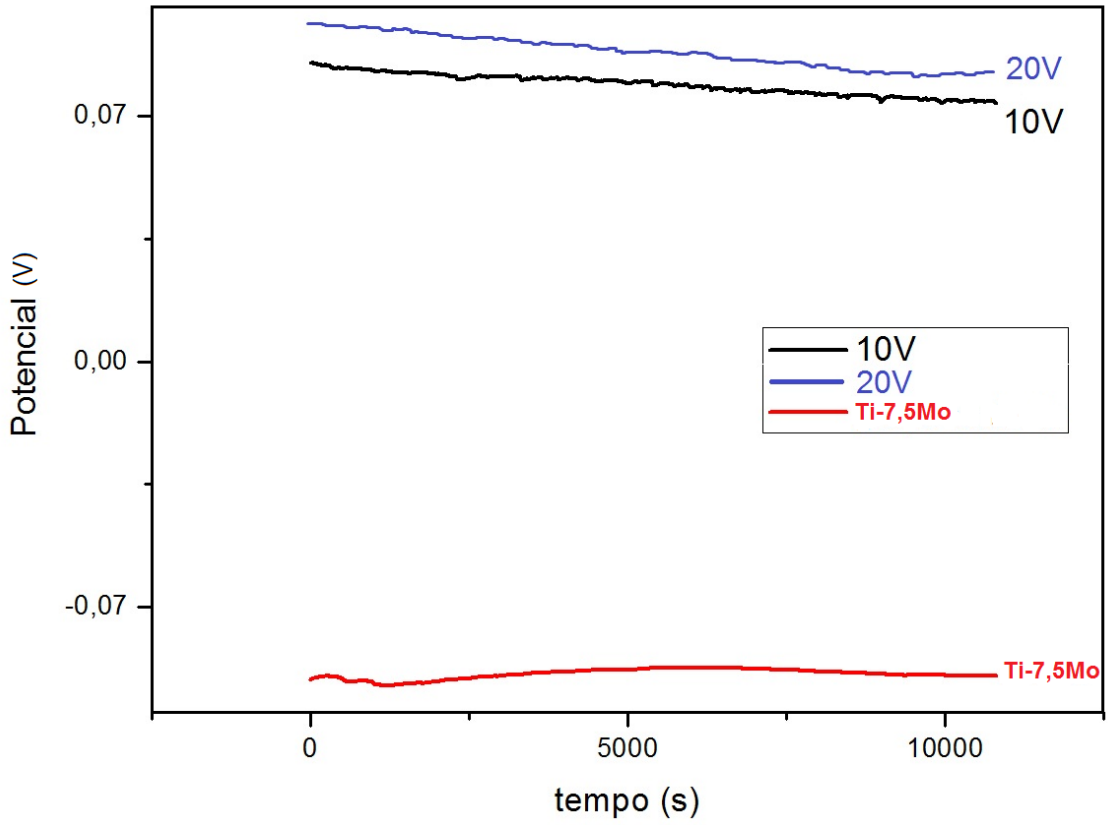


Fonte: Autor

4.3 ENSAIO ELETROQUÍMICO

O ensaio eletroquímico de potencial de circuito aberto foi realizado com o objetivo de verificar a estabilidade e o comportamento da liga Ti-7,5Mo no meio SBF antes e após o tratamento superficial de oxidação anódica. A Figura 33 mostra a curva do potencial de circuito aberto (V) em função do tempo (s) para a amostra com superfície lixada, amostra com superfície anodizada e calcinada em 10 V e em 20 V.

Figura 33 – Curva de potencial em circuito aberto para as três condições da liga de Ti-7,5Mo.



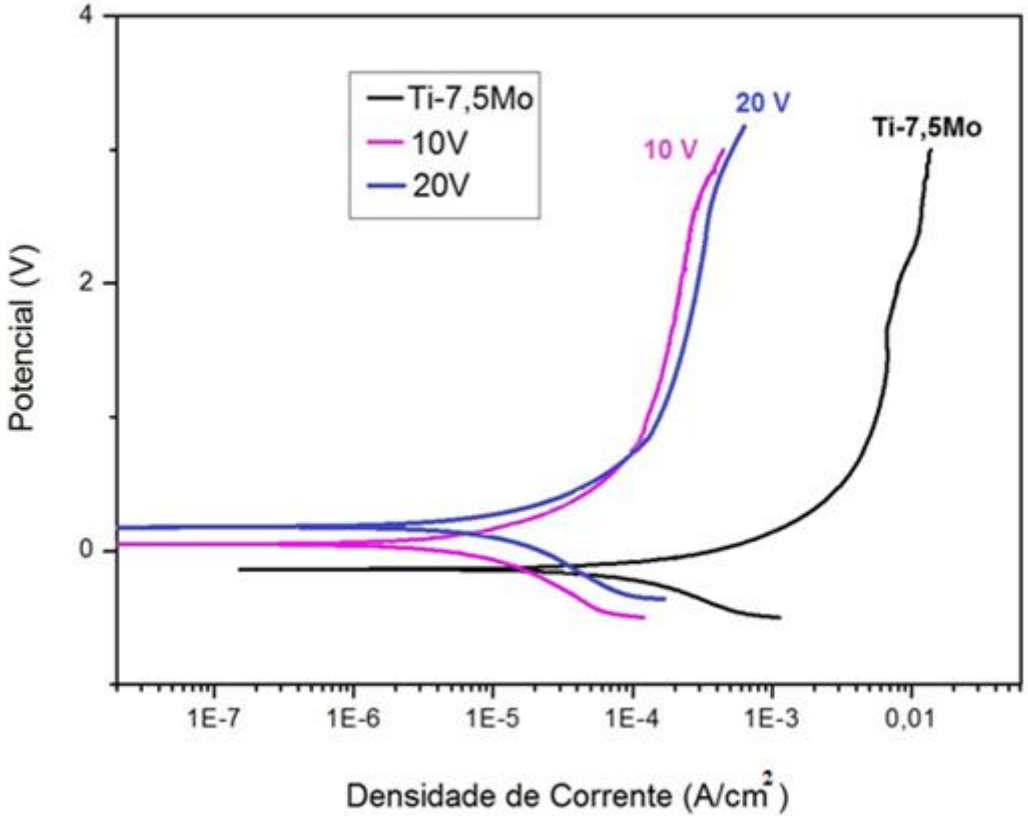
Fonte: Autor

Na curva de potencial de circuito aberto verificamos que a liga que não recebeu o tratamento químico de anodização é mais susceptível ao ataque se comparado com as ligas tratadas. Durante o intervalo de 3,5 horas observado no ensaio, a liga não tratada apresentou um comportamento com pouca variação dentro de um intervalo negativo. As

ligas anodizadas em 10 V e 20 V e calcinadas à 450 ºC mostraram pequenas variações dentro de uma margem de potencial positivo durante o mesmo intervalo de tempo.

As curvas de polarização verificam a agressividade das soluções e seu efeito sobre os metais por meio das correntes resultantes da faixa de passivação.

Figura 34 – Curva de polarização condições da liga de Ti-7,5Mo.



Fonte: Autor

Nas amostras anodizadas em 10 V e 20 V o potencial de corrosão é maior se comparado com a amostra não tratada (grupo controle). Este fato mostra que as amostras tratadas possuem comportamento mais nobre, ou seja, são mais resistentes à corrosão que as não tratadas com o filme de nanotubos de óxido de titânio.

Tabela 13 – Parâmetros dos valores eletroquímicos E_{ca} (V), j_{corr}(A/cm^2), j_{pass} (A/cm^2) E=1,5V, para Ti-7,5Mo, 10 V e 20 V.

	Parâmetros		
Superfície	**E_{ca} (V)**	**j_{corr}(A/cm^2)**	**j_{pass} (A/cm^2) E=1,5V**
Ti-7,5Mo	-0,090	7,80 10^{-5}	6,80 10^{-3}
10 V	+0,045	7,00 10^{-6}	1,80 10^{-4}
20 V	+0,051	7,40 10^{-6}	1,84 10^{-4}

Fonte: autor

O comportamento observado na região passiva para densidade de corrente obtida pelo método Tafel de estrapolação (**j_{pass}**) acompanha o comportamento obtido pelos valores de (**j_{corr}**) para as amostras anodizadas em 10V e 20V seguidas de calcinação à 450ºC. Entretanto, os valores obtidos para a densidade de corrente da de ordem passiva são muito altas para ligas de Ti, levando a crer que as ligas não estão passivadas.

Como mencionado anteriormente (PARK et al. 2010), as amostras com anodizadas e calcinadas seguiram a mesma tendência de estudos anteriores e se mostraram mais resistentes à corrosão que a liga sem os nanotubos. Com relação entre a resistência à corrosão entre as amostras analisadas em 10 V e 20 V, embora seja mínima, há diferença entre os resultados que pode ser explicada devido a diferença entre o diâmetro dos nanotubos, tornando o óxido mais poroso (RAFIEERAD et al. 2015), ou ainda pela mudança no comportamento de condutibilidade do óxido que ainda precisa ser avaliada com estudos mais aprofundados da capacitância e impedância da camada de óxido formada no material.

4.4 ESTUDOS IN VITRO

A análise da adesão bacteriana foi realizada para verificar a eficiência da incorporação da clorexidina à superfície da liga contendo nanotubos de TiO_2. O número

de unidades formadoras de colônia é mostrado nas tabelas 14 e 15 . É possível observar que para os dois valores de tensão avaliados a incorporação de clorexidina resultou na redução da adesão bacteriana e também de fungos (Candida). Isso confirma a eficiência da incorporação da clorexidina e eficácia da anatase na funcionalização.

Tabela 14 – Atividade bactericida da clorexidina a 2% S. *Aureus*

Condição	**TNT**	**TNT + CH**
10 V	3,83 ± 0,61	0,81 ±0,53
20 V	7,01 ± 2,61	0,0

Fonte: autor

Tabela 15 - Atividade antifungica da clorexidina a 2% - Candida

Condição	**TNT**	**TNT + CH**
10 V	2,34 ± 0,89	0,0
20 V	6,,39 ± 0,41	0,0

Fonte: autor

5. CONCLUSÕES

A partir da realização dessa pesquisa foi possível concluir que:

- A variação do potencial da anodização influenciou no diâmetro dos nanotubos sendo os valores encontrados proporcionais à tensão aplicada.

- O ensaio eletroquímico mostrou que ambos filmes com nanotubos de óxido de titânio tornaram o material mais nobre com relação e mais resistentes à corrosão se comparado com a liga Ti-7,5Mo.

- Após a anodização as duas superfícies apresentaram o mesmo comportamento no que diz respeito à adesão bacteriana. A clorexidina se mostrou eficaz como agente bactericida e antifúngico. No entanto, não foi possível quantificar a taxa de liberação.

5.1. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos se propõe para dar continuidade a pesquisa as seguintes análises:

- Análise HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para análise da liberação de clorexidina.
- Ensaio eletroquímico para análise da capacitância e superfície ativa do material.
- Análise da adesão celular.

REFERÊNCIAS

ALBREKTSSON T, ZARB G, WORTHINGTON P, ERIKSSON AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. Int J Oral Maxillofac Implants. 1986;1(1):11-25

AZEVEDO, C R F., HIPPERT, E. Análise de falhas de implantes cirúrgicos no Brasil: a necessidade de uma regulamentação adequada. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n.5, p. 55-61, mês. 2002.

BARBOUR, M.E., O'Sullivan, D.J., Jagger, D. C. Chlorhexidine adsorption to anatase and rutile titanium dioxide, **Surface Science** 2007.

BAUER, S.; PARK, J.; FALTENBACHER, J.; BEGER, S.; MARK, K.; SCHIMUKI, P.. "Size selective behavior of mesenchymal stem cells on ZrO2 and TiO2 nanotube arrays". Integrative Bioligy 1 (2009) 525-532.

BENTO, C.A.S., "Estudo da Interface Ti-6al-4v/TiO_2 por **Microscopia Eletrônica de Varredura**",Dissertação M.Sc., USP, São Carlos, 2000.

BERGER, S,; ALBU, S. P.; SCHMIDT-STEIN, F., HILDEBRAND H.; SCHMUKI, P.; HAMMOND, J. S.; PAUL, D. F.; REICHLMAIER, S.. "The origin for tubular growth of TiO_2 nanotubes: A fluoride rich layer between tube-walls". **Surface Science** 605 L57–L60.

BRANEMARK, P I. Introducción a la oseointegración. In: BRANEMARK, PI; ZARB,G A.; ALBREKTSSON, T. Prótesis tejido-integradas. La oseointegración en la odontología clínica. **Kempton**: Quintessenz VerlagsGmbh. Cap.1, p. 11-76, 1987.

CHAVES, J M, ESCADA A L A, ALVES CLARO, A P R. Characterization of the structure, thermal stability and wettability of the TiO2 nanotubes growth on the Ti–7.5Mo alloy **Surface Science**, P. 76 – 82, jan. 2016.

CHEN B, LU KATHY. "Selective focused-ion-beam sculpting of TiO_2 nanotubes and mechanism understanding". **Journal of Physical and Chemistry***:* 2013, V **15**, pp 1854-1862.

CHEN, QIZHI e THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering**: R: Reports. v. 87, p. 1-57, 2015.

CHU, S. Z.; WADA, Z.; INOUE, S.; ISOGAI, M.; YASUMORI, A.. "Fabrication of Ideally Ordered Nanoporous Alumina Films and Integrated Alumina Nanotubule Arrays by High-Field Anodization". **Advanced Materials** 17 (2005) 2115–2119.

CORTIZO, M.C.; OBERTI, T.G.; CORTIZO, M.S.; CORTIZO A. M.; MELE, M. A. F. L. "Chlorhexidine delivery system from titanium/polybenzyl acrylate coating: Evoluation of cytotoxicity and early bacterial adhesion". **Jornal of Dentistry** 40 (2012): 329-337.

ERCAN B, KUMMER K M, TARQUINIO K M, WEBTER T. "Decreased *Staphylococcus aureus* biofilm growth on anodized nanotubular titanium and the effect of electrical stimulation". **Acta Biomaterialia**: Volume 7, Issue 7, July 2011, Pages 3003–3012.

ERCAN B, TAYLOR E, ALPASLAN ECE, WBSTER T J. "Diameter of titanium nanotubes influences anti-bacterial efficacy". **Nanotechnology**, Volume 22, Number 29, July 2011.

ESCADA, A. L. A. Crescimento de Nanotubos de TiO_2 na Superfície da Liga Ti-7,5MoEmpregando Oxidação Anódica. 2012, Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia, Campus de Guaratinguetá, São Paulo, Guaratinguetá, 2012.

ESCADA A L A, MACHADO J P B, SCHNEIDER S G, NAKAZATO R Z, ALVEZ CLARO A P R. "Growth of calcium phosphate using chemically treated titanium oxide nanotubes". **Journal of Nano research**: Vol 16, pp 63-68 (2011).

GEETHA, M., A.K. SINGH, K. MURALEEDHARAN, A.K. GOGIA, E R. ASOKAMANI. "Effect of thermomechanical processing on microstructure of a Ti–13Nb–13Zr alloy." **Journal of Alloys And Compounds** 329 (2001): 264-271.

GEETHA, M., A.K. SINGH, R. ASOKAMANI, E A.K. GOGIA. "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review." Progress in Materials Science 54 (2009): 397-425.

GEETHA, M., SINGH, A.K., ASOKAMANI, R., GOGIA, A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. Progress in **Materials Science**, v. 54, n.3, p. 397 - 425, maio. 2009

GHICOV, A., SCHMUKI, P. Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO2 nanotubes and other self-aligned MOx structures. **The Royal Society of Chemistry**, p.2791-2808, 2009.

GOODMAN S.B. "Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system Biomaterials". **Elsevier Biomateriais** (2007) V. 28, I 34, 5044-5048.

GONGADZE, E.; KOBASO, D.; PARK, J.; SCHMUKI, P.; IGLIC, A.; 2012 Mini Rev. Med. Chem. 13-94.

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

HALLAB, N.J., S. ANDERSON , T. STAFFORD, E J.J. JACOBS. "Hypersensitivity responses in patients with total hip arthroplasty." **Journal of Orthopaedic** Research 23 (2005): 384-391.

HRUSKA, A.R., BORELLI, P. Quality criteria for pure titanium casting, laboratory soldering, intraoral welding, and a device to aid in making uncontaminated castings. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.66, n.4, p.561-565, 1999.

KABASO, D.; GONGADZE, E.; PERUTKOVÁ, S.; MATSCHEGEWSKI, C.; KRALJ-IGLIČ, V.; BECK, U.; VAN RIENEN, U.; IGLIČ, A.; "Mechanics and electrostatics of the interactions between osteoblasts and titanium surface". **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering** (2011) 469-482.

KEEGAN G. M., LEARMONTH, I.D., CASE C. P.. "Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient" A REVIEW OF CURRENT KNOWLEDGE AND FUTURE STRATEGIES. **The bone and joint journal**: V. 89 (2007) p. 567-573.

KIM, H.W., LEE, S.B., OH, K.T., The release of behavior of CHX from polymer-Coated titanium surfaces. **Surface and Interface Analysis** Research, v. 40, n,3, p.202-204, jan.2008.

KLEIN, A., FREDEL, M.C.,WENDHAUSEN, P.A.P., "Novos Materiais: Realidade e Tendências de Desenvolvimento", **Revista Nexus**, maio de 2001, disponível em: <www.revistanexus.com.br>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2004

KOZLOVSKY, A.; ARTZI, Z.; MOSES, O.; BELSKY, N. K.; GREENSTEIN, R. B. N.. "Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces". **Jornal of Periodontal** 77 (2006): 1194-1200.

KULKARNI, M.; MAZARE, A.; GONGADZ, E.; PERUTKOVA, S.; KRALJ-IGLIČ, MILOŠEV, P. I.; SCHMUKI P.; IGLIČ A.; MOZETIČ M.. "Titanium nanostructures for biomedical applications". IOP **Science Nanotechnology** 26 (2015): 062002.

KULKARNI, M. et al. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications**. Nanomedicine**, v. 111, p. 111, 2014.

KUNZE J.; MÜLLER, L.; MACAK, J. M.; GREIL, P.; SCHMUKI, P.; MÜLLER, A.; "Time-dependent growth of biomimetic apatite on anodic TiO_2nanotubes". 26 (2015) 01 – 18.

LANG NP, MOMBELLI A, TONETTI MS, BRÄGGER U, HÄMMERLE CH. Clinical trials on therapies for peri-implant infections. **Ann Periodontol**. 1997 Mar; 2(1): 343-56.

LAUSMAA, J. Mechanical, thermal, chemical and electrochemical surface treatment of titanium. **In Medicine**. Primeira Edição. Berlin-Heidelberg: Springer , 2001. 232-266 p.

LAVENUS S, LOUARN G, LAYTOLLE P.. Nanotechnology and Dental Implants: Volume 2010, Article ID 915327, 9 pages

LEE, K.; KIM, J.; KIM, H.; LEE, Y.; TAK, Y.; KIM, D.; SHMUKI, P.. "Efect of electrolyte conductivity on the formation of a nanotubular TiO2 photoanode for a dye-sensitized solar cell". **Journal of the Korean Physical Society** 54, (2009) 1027-1031.

LEE K, KIM J, Kim H, Lee Y, KIM D, SCHMUKI P, TAK Y, **Journal of Korean Physycs Society**: volume 54, PP 1027–1031. (2008).

LI, G., LIU, Z.Q., LU, J., WANG, L., ZHANG, Z. Effect of calcination temperature on the morphology and surface properties of TiO2 nanotube arrays. **Applied Surface Science**, v.255, n. 16, p.7323-7328, maio 2009.

LIU, C., WANG, Y., WANG M., HUANG, W., CHU, P., Electrochemical stability of TiO2 nanotubes with different diameters in artificial saliva. **Surface and Coatings Technology**, v.47, n.3-4, p. 63-67, dez. 2011.

LIM, Y.J., OSHIDA, Y., ANDRES, C.J., BARCO, M.T. Surface characterizations of variously treated titanium materials. **Inernational Journal of Oral Maxillofaial Implants**, v.16, n.3, p.333-342, maio-junho 2001.

MACAK J M, HILDEBRAND H, MARTEN-JAHNS U AND SCHMUKI P. mechanistic aspects and growth of large diameter self-organized TiO2 nanotubes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, n. 2, p. 254-266, set.2008.

MACAK, J.M., ALBU, S.P., SCHMUKI, P. TiO2 nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications Current Opinion in **Solid State and Materials Science**, v.11 , p.3-18, 2007.

MACAK, J. M.; TSUCHIYA, H.; SCHMUKI, P.; "High-Aspect-Ratio TiO_2 Nanotubes by Anodization of Titanium". **Angewandte Chemie International** 44, (2005) 2100–2102

MAZARE A, IONITA D. "Calcination condition effect on microstructure, electrochemical and hemolytic behavior of amorphous nanotubes on Ti6Al7Nb alloy". **Surface and Coatings Technology:** Volume 252, 15 August 2014, Pages 87–92.

MINAGAR, S., BERNDT, C.C., WANG, J., IVANOVA, E., WEN, C. A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. **ActaBiomaterialia**, v.8, n.8, p.2875-2888, agosto 2012.

NEACSU, P. et al. In vitro performance assessment of new beta ti–mo–nb alloy compositions. **Materials Science And Engineering**: C. V. 47, P. 105-113, 2015.

PARK, H. H.; PARK, I. S.; KIM, K, S.; JEON, W. Y,; PARK, B. K.; KIM, H. S.; BAE, T. S.; LEE, M. H.. "Bioactive and electrochemical characterization of TiO2 nanotubes on titanium via anodic oxidation". **Electrochimica Acta** 55 (2010): 6109-6114.

PARK, JOON B., E JOSEPH D. BRONZINO. Biomaterials: principles and applications. **Boca Raton**: CRC Press, 2003.

PARK J, BAUER S, MARK K, SCHMUKI P. " Nanosize and Vitality: TiO_2 Nanotube Diameter Directs Cell Fate" *Nano Letters:* 2007, v.7 n.6, pp 1686–1691.

PEREIRA, C.A., ROMEIRO R.L., COSTA, A. C., MACHADO, A.K., JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O. "Susceptibility of Candida albicans, Staphylococcus aureus, and Streptococcus mutans biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study". **Lasers Med Sci**. 2011 May;26(3):341-8.

PRAKASAM E H, SHANKAR K, PAULOSE M, VARGHESE O K, GRIMES G A. "A New Benchmark for TiO_2 Nanotube Array Growth by Anodization". **Journal of Physical and Chemistry:** *v* 111 (20), pp 7235–7241

REIS e ELIAS. Ligas de NiTi com superelasticidade e memória de forma. **Revista Brasileira de Odontologia**. v. 58, n. 5, p. 300-304, set.-out. 2001.

REGONINI, D.; BOWEN, C. R.; JAROENWORALUCK, A.; STEVENS, R.. "A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO2 nanotubes". **Materials Science and Engineering** 74, (2013) 377-406.

REGONINI, D.; SATKA, A.; ALLSOPP, D. W. E.; JAROENWORALUCK, A.; STEVENS, R.; BOWEN, C. R.. "Anodised Titania Nanotubes Prepared in a Glycerol/NaF Electrolyte". **Journal Nanoscience and Nanotchnology** volume 9, Number 7, (2009) 4410-4416.

REVERLL P.A. "The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses". **Jornal of the Royal Society Interface**. (2008) DOI: 10.1098/rsif.2008.0142.

ROY, P., BERGER, S., SCHMUKI, P. TiO2 Nanotubes: Synthesis and Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v.50, pp. 2904 - 2939, 2011.

SCHARNWEBER, D., BEUTNER, R..; RÖβLER, S. et al. Electrochemical behavior of titanium-based materials – are there relations to biocompatibility?", **Journal of aterials Science: Materials in Medicine**, v. 13, pp. 1215-1220, 2002.

SOBIESZCZYK, S. Surface modification of Ti and its alloys. **Advances in Materials Science**, v.10, n.1, p.29-42, 2010.

SU, BAUER, S., PITTROF, A., TSUCHIYA, H., SCHMUKI P. Size-effects in TiO**2** nanotubes: Diameter dependent anatase/rutile stabilization. **Electrochemistry Communications** v.13, n.6, p.538-541, 2011.

SUL, Y. T., JOHANSSON, C. B., JEONG, Y., ROSER, K., et al. Oxidized implants and their influence on the bone response. **Journal of Materials Science: Material in Medicine**, v.12, 2001a. 1025-1031 p.

SUL, Y. T., JOHANSSON, C. B., PETRONIS, S., KROZER, A., et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: The oxide thickness, micropore configuration, surface roughness, crystal structure and chemical compositions. **Biomaterials**, v.23, 2002d. 491-501 p.

TAVEIRA L V, MACAK J M, SIROTNA K, DICK L F P, SCHMUKI P S. "Voltage Oscillations and Morphology during the Galvanostatic Formation of Self-Organized TiO_2 Nanotubes". **Journal of Electrochemical Society**: volume 153, issue 4, B137-B143 (2006).

TAVEIRA LV, MACAK JM, TSUCHIYA H, DICK LFP, SCHMUKI P. Initiation and Growth of Self-Organized TiO2 Nanotubes Anodically Formed in NH4F(NH4)2SO4 Electrolytes. **Journal of Electrochemical Society** v.152, n.10 p.B405-B410, 2005.

THÉBAULT, F.; VUILLEMIN, B.; OLTRA, R.; KUNZE, J.; SEYEUX, A.; SCHMUKI, P.. "Modeling of Growth and Dissolution of Nanotubular Titania in Fluoride-Containing Electrolytes". **Electrochemical and Solid-States Letter** 12, (2008) C5-C9.

VALOTA A, CURIONI M, LECTERE D J, SHELDON P, THOMPSON G E. "Influence of Applied Potential on Titanium Oxide Nanotube Growth". **Journal of Electrochemical Society**: volume 157, issue 12, K243-K247 (2010).

VELTEN, D., BIEHL, V., AUBERTIN, F. VALESKE, B., POSSART, W., BREME, Preparation of TiO2 layers on cp-Ti and Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation and bysol-gel coating techniques and their characterization. **Journal of Biomedical materials Research**, v. 59, n.1, p. 18-28, jan. 2002.

WANG J, LIN ZHIQUN. “Anodic Formation of Ordered TiO_2 Nanotube Arrays: Effects of Electrolyte Temperature and Anodization Potential”. V. *113* (10), pp 4026–4030 (2009).

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008. WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.

Williams D F 1981 Biocompatibility of Clinical Implant Materials vol 1 (Boca Raton, Florida: CRC Press)

WUZONG, Z.. “Pore diameter control in anodic titanium and aluminium oxides”. **Journal of Materials Chemistry** 21, (2011) 357-362.