

JOÃO PEDRO AQUILES CAROBOLANTE

**Modificação da superfície da liga experimental Ti10Mo8Nb empregando oxidação
anódica – estudos *in vitro***

JOÃO PEDRO AQUILES CAROBOLANTE

Modificação da superfície da liga experimental Ti10Mo8Nb empregando oxidação anódica – estudos *in vitro*

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

Orientadora: Ana Paula Rosifini Alves Claro

Guaratinguetá – SP
2017

C292
m

Carobolante, João Pedro Aquiles

Modificação da superfície da liga experimental Ti10Mo8Nb
empregando oxidação anódica / João Pedro Aquiles Carobolante –
Guaratinguetá, 2017.

90 f : il.

Bibliografia: f. 79-85

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Engenharia de Guaratinguetá, 2017.

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

1. Materiais biomédicos. 2. Ligas de titânio. 3. Engenharia
biomédica. I. Título

CDU 620.1(043)

JOÃO PEDRO AQUILES CAROBOLANTE

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

PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA: MATERIAIS

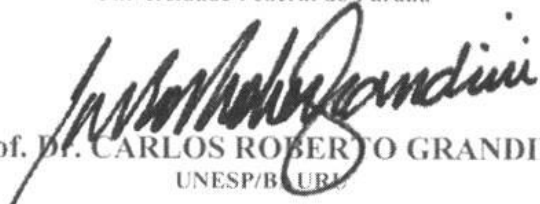
APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO


Prof. Dr. José Antonio Perrella Balestieri
Coordenador

BANCA EXAMINADORA:


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


Prof. Dr. CLAUDIA ELIANA BRUNO MARINO
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. CARLOS ROBERTO GRANDINI
UNESP/Bauri

DADOS CURRICULARES

JOÃO PEDRO AQUILES CAROBOLANTE

NASCIMENTO	04.12.1990 – Santa Fé do Sul / SP
FILIAÇÃO	Pedro Vanderlei Carobolante Vera Lucia de Sousa Carobolante
2009/2015	Curso de Graduação Engenharia de Materiais – Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá
2015/2017	Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, nível de Mestrado, na Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista

Dedico este trabalho à minha família pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora *Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro* por todo incentivo, motivação e dedicação;

aos meus pais, *Pedro* e *Vera*, que sempre me incentivaram nos estudos, e ao meu irmão, *Lucas*, pelo apoio durante estes anos;

aos amigos do Grupo de Biomateriais pelo apoio e ajuda;

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

ao *Prof. Dr. Roberto Zenhei Nakazato* por toda a ajuda durante o desenvolvimento do trabalho;

ao *Prof. Dr. Luís Rogério de Oliveira Hein* e ao *Dr. Javier Andrea Munoz Cortez*, pela colaboração na microscopia eletrônica de varredura.

ao *Prof. Dr. Ketul Popat* e à *Dr^a. Cristiane Aparecida Pereira* pela colaboração nas análises *in vitro*;

ao *Prof. Dr. Rubens Caram Junior* pela colaboração na realização do DSC;

ao *Dr. João Paulo Barros Machado* pela realização da DRX, MEV e Espectroscopia Raman;

ao Departamento de Engenharia de Materiais da USP/EEL por disponibilizar o Laboratório de Conformação Mecânica;

aos alunos de pós-graduação *Reginaldo Toshihiro Konatu*, *André Luis Reis Rangel* e *Adelvam Pereira Junior*, pela colaboração no processamento da liga, e *Felipe Vicente de Paula Koidara* na ajuda durante a análise de energia de superfície;

“Ser; pronunciado tão depressa, e cabe tantas coisas?”

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

Titânio e suas ligas são amplamente empregados em aplicações biomédicas, devido a sua biocompatibilidade e excelentes propriedades de volume, como resistência mecânica. As ligas de titânio tipo β com baixo módulo de elasticidade, como Ti10Mo8Nb, são indicadas para amenizar o efeito “*stress shielding*”, característico da interface implante/osso. No entanto, quando materiais bioinertes são inseridos no corpo humano não induzirão uma resposta específica. As técnicas de modificação de superfície, como crescimento de nanoestruturas de TiO_2 , são utilizadas para alterar as propriedades de superfície desses materiais permitindo melhor resposta. O objetivo dessa pesquisa é a modificação de superfície da liga experimental Ti10Mo8Nb a partir do crescimento de nanoestruturas de TiO_2 . Os lingotes da liga experimental Ti10Mo8Nb foram obtidos a partir da fusão dos metais puros em forno a arco voltaico. A oxidação anódica potencioestática foi realizada utilizando um eletrólito formado por glicerina e H_2O (1:1, em vol.) com adição de 2,7 % (m/v) de NH_4F sob 20 V durante 3 h, a temperatura ambiente. Após o tratamento as amostras foram calcinadas. A superfície da liga foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), ângulo de contato, medidas da energia de superfície, espectroscopia de raios X por dispersão em energia (XPS). Estudos *in vitro*, como adesão celular e bacteriana, foram realizados para avaliar a resposta desse tratamento. A liga Ti10Mo8Nb apresentou fase beta após o processamento, além de diminuição da temperatura β -transus. Após o tratamento de superfície se obteve uma camada nanoporosa de TiO_2 . As análises *in vitro* apresentaram viabilidade do crescimento celular e diminuição da proliferação bacteriana.

PALAVRAS-CHAVE: Biomateriais. Titânio. Ligas de titânio. Oxidação anódica. Modificação de superfície.

ABSTRACT

Titanium and its alloys have been widely used as biomedical material due their biocompatibility and excellent bulk properties, such as mechanical strength. β titanium alloys with low modulus of elasticity, such as Ti10Mo8Nb, are suitable to relieve the stress shielding effect that occurs in the interface implant/bone. However, when these materials are inserted inside human body the surface properties will not induce a specific response. Surface modifications techniques can be used for change the inert surface of these alloys, e.g. TiO_2 nanostructure growth by using anodic oxidation. The purpose of this research is the surface modification of Ti10Mo8Nb experimental alloy by using TiO_2 nanostructure growth. Ingots of Ti10Mo8Nb experimental alloy were produced by fusion from sheets of molybdenum, niobium and titanium commercially pure in arc melting furnace under argon atmosphere. The potentiostatic anodic oxidation was performed using an electrolyte formed of glycerol and H_2O (1: 1 by vol.) with addition of 2.7% (w/v) NH_4F under 20 V for 3 h at room temperature. After the surface treatment, the samples were annealing. The surface of the alloy was analyzed by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), contact angle, surface energy measurements, energy dispersive X-ray spectroscopy (XPS). In vitro studies, such as cell and bacterial adhesion, were performed to evaluate the response of this treatment. The Ti10Mo8Nb alloy exhibited beta phase after the processing, and also occurred a decrease in β -transus temperature. After the surface treatment a nanoporous layer of TiO was obtained. The anatase phase was found in the annealed samples (450 °C for 3 hours). In vitro analyzes showed cell growth viability and decreased bacterial proliferation due to larger specific surface area.

KEYWORDS: Biomaterials. Titanium. Titanium alloys. Anodic oxidation. Surface Modification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (a) Dedo artificial encontrado em uma múmia egípcia, datado entre 950 – 710 a.C. (b) Dedo artificial egípcio fabricado a partir de linho e resinas, datado de 600 a.C. e (c) réplica da perna artificial feita em bronze encontrada em Cápuia, datada de 300 d.C.	16
Figura 2 - Exemplo de aplicações de biomateriais metálicos: (a) stent e (b) grampo para aneurisma.....	19
Figura 3 - O titânio é um elemento alotrópico, apresentando estrutura hexagonal compacta (HC) e, acima de 883 °C, estrutura cúbica de corpo centrado (CCC).	23
Figura 4 - Estruturas cristalinas do TiO_2 : (a) rutilo (tetragonal), (b) anatase (tetragonal) (c) broquita (ortorrômbica).	24
Figura 5 - Influência dos elementos de na formação das fases de ligas de Ti.....	24
Figura 6 - Módulo de elasticidade dos três principais grupos de biomateriais metálicos.	26
Figura 7 - Micrografia óptica da liga $\text{Ti}_{10}\text{Mo}_8\text{Nb}$, apresentando fase β	27
Figura 8 - Imagens de fluorescência de filamentos de actina (vermelho) e vinculin (verde) em células MC3T3-E1 pré-osteoblastos cultivadas em ligas do sistema Ti-Mo-Nb.	29
Figura 9 – Representação de uma célula eletrolítica utilizada durante a oxidação anódica. ...	32
Figura 10 – Representação dos processos químicos que ocorrem durante a oxidação anódica do Ti.	33
Figura 11 - Diferentes morfologias da camada de óxido resultante de oxidação anódica sob diferentes parâmetros.	34
Figura 12 - Ilustração sobre o processo de formação de camadas porosas e nanotubos.....	35
Figura 13 - Representação dos resultados obtidos por Siejka et al. (1977). Formação de um filme (a) denso e (b) poroso, após anodização em meio contendo O^{18} , seguido de anodização em eletrólito livre de O^{18}	36
Figura 14 – Representação dos (a) processos de dissolução e formação do TiO_2 em meios contendo íons F^- e do (b) processo de crescimento dos nanotubos.	37
Figura 15 - Representação da formação de nanotubos de TiO_2 com aspecto da parede ondulado: (a) reações na interface óxido/metal; (b) formação de bolhas de O_2 ; (c) união das bolhas pela dissolução do TiO_2 ; (d) formação de nanotubos.	39
Figura 16 - Nanotubos de TiO_2 formados com eletrólitos da (a) primeira, (b) segunda, (c) terceira e (d) quarta geração.	40
Figura 17 - Relação entre tensão e diâmetro (interno e externo) dos nanotubos de TiO_2	41
Figura 18 - Nanotubos de TiO_2 após calcinação a (a) 200 °C, (b) 400 °C, (c) 450 °C, (d) 500 °C, (e) 600 °C e (f) 800 °C.	43
Figura 19 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da liga $\text{Ti}_6\text{Al}_7\text{Nb}$ após anodização.	44
Figura 20 - Representação da relação entre as propriedades de superfície e a resposta biológica.	45
Figura 21 — MEV de células MC3T3 – E1 em camada de TiO_2 (a) porosa, (b) intermediária (entre camada porosa e tubular) e (c) nanotubular.	46
Figura 22 – Fluxograma da metodologia aplicada nesse trabalho.	48
Figura 23– Metais utilizados para preparo da liga, após corte: (a) titânio, (b) molibdênio e (c) nióbio.	49
Figura 24 – (a) Forno a arco voltaico. (b) Interior do forno, detalhando o cadinho de cobre e eletrodo de tungstênio.	49
Figura 25– (a) Forno com tubo de quartzo utilizado nos tratamentos térmicos e equipamentos utilizados durante o (b) forjamento do lingote e (a) corte (b) das amostras.	50
Figura 26– Amostras de $\text{Ti}_{10}\text{Mo}_8\text{Nb}$ após (a) lixamento e (b) polimento.	51

Figura 27 – (a) Material utilizado durante o processo de oxidação anódica: eletrodo de platina e porta amostra. (b) Célula durante anodização.	52
Figura 28 – (a) Equipamento utilizada para embutir e (b) amostra após embutimento.....	54
Figura 29 – Equipamento de calorimetria exploratória diferencial.	55
Figura 30 – Difratoograma da liga Ti10Mo8Nb após tratamento térmico de solubilização.	60
Figura 31 – a) Microscopia da liga Ti10Mo8Nb, b) Histograma e valor médio dos diâmetros dos grãos.....	61
Figura 32 – Segundo aquecimento da calorimetria exploratória diferencial da liga Ti10Mo8Nb.	61
Figura 33 – (a) Imagem FE-MEV mostrando a superfície de topo da liga Ti10Mo8Nb e (b) difratograma de raios X do substrato e da liga Ti10Mo8Nb ambos após oxidação anódica em eletrólito formado pela adição de 2,7 g de NH ₄ F a cada litro da solução glicerol/água (1:1, em volume), sob tensão de 20 V durante 3 horas.....	62
Figura 34 - Imagem FE-MEV mostrando a superfície de topo da liga Ti10Mo8Nb após oxidação anódica em eletrólito formado pela adição de 2,7 g de NH ₄ F a cada um litro da solução glicerol/água (1:1, em volume), sob tensão de 20 V durante 3 horas e calcinadas a (a) 400 °C, (b) 450 °C, (c) 500 °C, (d) 550 °C, (e) 600 °C e (f) 650 °C.	64
Figura 35 - Espectros Raman da liga Ti10Mo8Nb após a anodização e calcinação.	65
Figura 36 – Difratoograma de raios X da liga Ti10Mo8Nb após anodização e calcinação.....	66
Figura 37– Imagens obtidas por FE – MEV da superfície da liga Ti10Mo8Nb após oxidação anódica e calcinação a 450 °C, vistas de (a) topo e (d) lateral, e (c) histograma dos diâmetros internos dos poros.	67
Figura 38 - Espectro do XPS da liga Ti10Mo8Nb e da superfície após anodização.	68
Figura 39 – Imagem obtida por MEV após cultura da bactéria <i>S. epidermidis</i> sobre a superfície lixada da liga Ti10Mo8Nb, com aumento de (a) 1000X e (b) 20000X.....	70
Figura 40 - Imagem obtida por MEV após cultura da bactéria <i>S. epidermidis</i> sobre a superfície lixada da liga Ti10Mo8Nb após anodização e calcinação, com aumento de (a) 1000X e (b) 20000X.	71
Figura 41 – Concentração de unidades formadoras de colônias após incubação da bactéria <i>S. epidermidis</i> sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb lixada (GI) e anodizada (GII).....	72
Figura 423 – Imagens de microscopia de fluorescência de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) com DAPI sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb lisa.	73
Figura 434 – Imagens de microscopia de fluorescência de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) com DAPI sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb anodizada.	74
Figura 446 – Morfologia das células adiposas (ADSC) após 1 dia de cultura sobre a superfície (a) lisa e (b) nanoporosa da liga Ti10Mo8Nb.	76
Figura 457 – Espalhamento das células ADSC sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb lisa (G1) e anodizada (G2). (*) p <0,05, (***) p <0,001 utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney para amostras independentes, software SPSS 13.0.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos tratamentos de modificação de superfícies, segundo Duan e Wang (2006).....	30
Quadro 2 - Condições de pré-tratamento da superfície.....	51
Quadro 3 – Composição dos eletrólitos testados.....	52
Quadro 4 – Condições de oxidação anódica com a solução 1.....	53
Quadro 5 – Condições de oxidação anódica com a solução 2.....	53
Quadro 6 – Condições de oxidação anódica com a solução 3.....	53
Quadro 7 – Condições de oxidação anódica com a solução 4.....	53
Quadro 8 – Condições de oxidação anódica com a solução 5.....	54
Quadro 9 – Condições de oxidação anódica com a solução 6.....	54
Quadro 10 – Ângulo de contato entre a superfície da amostra e água deionizada e energia de superfície total, com a utilização de água deionizada e etilenoglicol.	69
Quadro 11 – Paramêtros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H ₂ O (1:1, em vol.) + 0,27% (m/v) de NH ₄ F.	86
Quadro 12 – Paramêtros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H ₂ O (3:1, em vol.) + 1,25% (m/v) de NH ₄ F.	87
Quadro 13 – Paramêtros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H ₂ O (1:1, em vol.) + 1,00% (m/v) de NH ₄ F.	88
Quadro 14 – Paramêtros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H ₂ O (9:1, em vol.) + 0,25% (m/v) de NH ₄ F.	89
Quadro 15 – Paramêtros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H ₂ O (1:1, em vol.) + 0,27% (m/v) de NH ₄ F.	89
Quadro 16 – Paramêtros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H ₂ O (1:1, em vol.) + 0,27% (m/v) de NH ₄ F.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TMN	Liga Ti ₁₀ Mo ₈ Nb
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DRX	Difratometria de raios X
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FE – MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução

SUMÁRIO

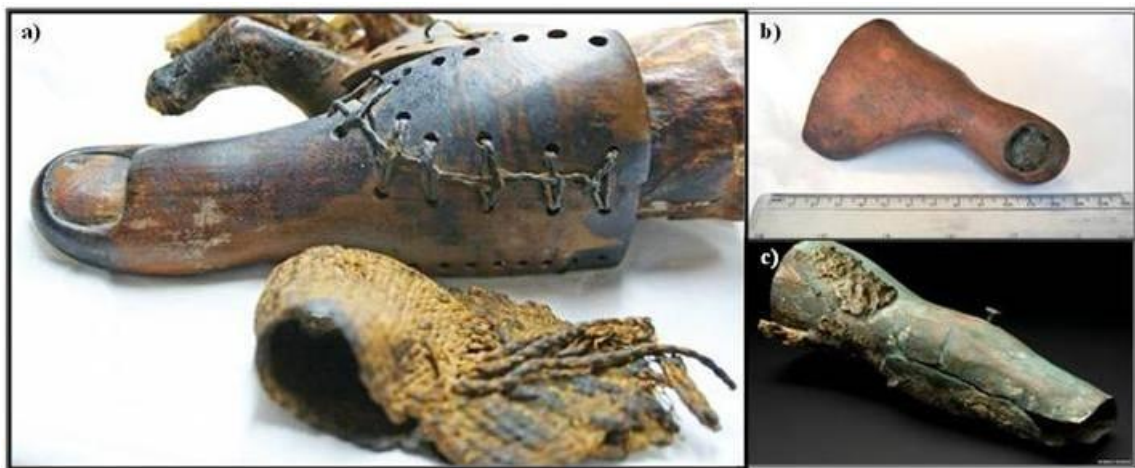
1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
2.2	TITÂNIO E SUAS LIGAS	22
2.2.1	Estudos de ligas de titânio para uso biomédico	27
2.3	MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE	29
2.4	TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE: OXIDAÇÃO ANÓDICA	30
2.4.1	Considerações gerais.....	31
2.4.2	Eletrólito.....	37
2.4.3	Potencial de anodização	41
2.4.4	Tempo de anodização.....	41
2.4.5	Temperatura	42
2.4.6	Estudos avaliando o crescimento de nanoestruturas de TiO ₂ por anodização	42
2.4.7	Estudos <i>in vitro</i> em ligas de titânio após oxidação anódica	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1	PROCESSAMENTO DA LIGA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	49
3.2	OXIDAÇÃO ANÓDICA	51
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA LIGA.....	54
3.3.1	Microscopia óptica.....	54
3.3.2	Calorimetria exploratória diferencial	55
3.3.3	Difração de raios X	55
3.4	CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE	56
3.4.1	Microscopia eletrônica de varredura	56
3.4.2	Espectroscopia Raman.....	56

3.4.3 Difração de raios X	56
3.4.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X.....	56
3.4.5 Ângulo de contato	57
3.4.6 Energia de superfície	57
3.5 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> – ADESÃO CELULAR E PROLIFERAÇÃO BACTERIANA	57
3.5.1 Proliferação bacteriana	57
3.5.2 Cultura celular	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA LIGA.....	60
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE	62
4.3 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	70
5 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICE – Desenvolvimento dos parâmetros de anodização	86

1 INTRODUÇÃO

Desde a pré-história o homem procura reparar as deficiências do corpo humano, o que pode ser comprovado por meio de achados arqueológicos como suturas com mais de 32.000 anos, dentes artificiais e outros dispositivos, constatando-se sempre provas da preocupação em recuperar ou substituir funções perdidas do corpo, buscando melhorar a qualidade de vida (RATNER *et al.*, 2004; SAINI, 2015). De acordo com Nerlich *et al.* (2000), a prótese mais antiga encontrada (Figura 1(a)) é datada de 950-710 a. C. e pertenceu a “Tabaketenmut”, filha de um sacerdote egípcio. A prótese foi produzida a partir de madeira e couro com a função de substituir o dedão do pé direito, ajudando o caminhar. Outros dispositivos antigos, como outro dedo artificial egípcio (Figura 1 (b)) e a perna de bronze encontrada na cidade de Santa Maria di Cápuia Vetere (atual Cápuia, Itália) (Figura 1(c)), reforçam que, apesar de ser um conceito recente, a busca por materiais que possam ser mantidos em contato com o corpo para recuperar uma função é antiga (FINCH, 2011).

Figura 1 - (a) Dedo artificial encontrado em uma múmia egípcia, datado entre 950 – 710 a.C. (b) Dedo artificial egípcio fabricado a partir de linho e resinas, datado de 600 a.C. e (c) réplica da perna artificial feita em bronze encontrada em Cápuia, datada de 300 d.C.



Fonte: Finch (2011) e Prosthetics

Somente a partir da década de 1970 há uma definição mais clara do que são esses materiais que podem ser utilizados no reparo de organismos vivos: os biomateriais, que vinham sendo cada vez mais utilizados desde o final do século 19, devido a melhorias tanto na área médica, com a diminuição de infecções pós-operatórias, como na área de processamento de materiais, especialmente metais, onde era possível produzir em larga escala, em

consequência dos ganhos tecnológicos obtidos durante a Revolução Industrial (CHEN *et al.*, 2015; SHARMA, 2005; ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013).

O resultado dos motivos citados anteriormente juntamente com uma maior expectativa de vida da população, aumenta o interesse em pesquisas sobre materiais que possam substituir alguma deficiência de organismos vivos, principalmente o humano, fazendo com que materiais e técnicas sejam criados com o objetivo de se obter produtos com propriedades mais próximas ao dos organismos e/ou que facilitem tratamentos (CHEN *et al.*, 2015).

Desta forma, atualmente, é crescente o número de estudos que procuram melhorar as propriedades de superfície dos biomateriais, particularmente, em materiais com a função de substituir ou reparar tecidos ósseos, como no caso deste trabalho, onde se procura criar uma superfície com propriedades que proporcionem uma melhor interação com as células e propiciem uma melhor recuperação e/ou um tempo de vida maior para o paciente (GEETHA *et al.*, 2009).

1.1 OBJETIVOS

A partir do exposto, o objetivo geral desse trabalho é a modificação da superfície da liga experimental Ti10Mo8Nb empregando oxidação anódica para aplicação biomédica. Para atender a esse objetivo geral, deverão ser atendidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Caracterização da liga Ti10Mo8Nb com o objetivo de analisar a microestrutura após o processamento.
- b) Estudo dos parâmetros de oxidação anódica para se obter uma camada de TiO₂ porosa na superfície da liga Ti10Mo8Nb;
- c) Caracterização da camada de TiO₂ formada: avaliando a morfologia e microestrutura.
- d) Estudos *in vitro* com o objetivo de avaliar a adesão e proliferação celular e bacteriana.

Finalmente a maior meta desse trabalho é a possibilidade de obtenção de novos materiais biomédicos com melhor resposta biológica após inserção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na década de 1970 foi proposta uma definição para os materiais que em contato com o organismo tinham a função de reparar ou substituir estruturas biológicas: os biomateriais (SHARMA, 2005). Em uma definição mais recente, “um biomaterial é uma substância que tenha sido manipulada para assumir uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, seja usado para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico” (CHEN et al., 2015).

O histórico de pesquisas e estudos envolvendo biomateriais pode ser dividido em três períodos ou gerações, onde em cada uma se destaca uma característica ou propriedade mais relevante, referente à tecnologia e problemas a serem resolvidos naquele contexto social. Ali, Almaatoq e Mohamed (2013) descrevem esses três períodos da seguinte forma:

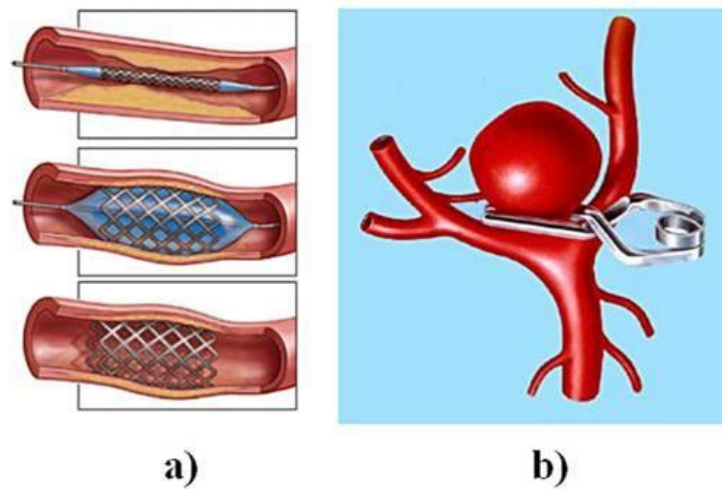
a) Primeira Geração: inclui as primeiras décadas após a segunda guerra mundial, 1950 a 1970. O principal objetivo era que o corpo não rejeitasse o material implantado e que esse apresentasse propriedades mecânicas minimamente suficientes. Tanto materiais naturais como sintéticos eram usados no tratamento dos pacientes. Também é conhecida como a geração dos materiais bioinertes.

b) Segunda Geração: essa segunda época demonstra maior interesse em materiais com um melhor desempenho, que mantenham a qualidade durante um maior período. Há o empenho em pesquisar materiais que provoquem respostas benéficas do organismo e materiais biodegradáveis. Essa geração se estende de 1970 até 2000.

c) Terceira Geração: é a geração atual, na qual ainda se procura compreender e melhorar os mecanismos da regeneração dos tecidos. Destaca-se o uso da micro e nanotecnologia e da combinação de produtos, como a incorporação de medicamentos em biomateriais.

Quanto à origem, os biomateriais podem ser naturais ou sintéticos, sendo utilizados metais (Figura 2), polímeros, cerâmicos ou uma combinação química ou física destes.

Figura 2 - Exemplo de aplicações de biomateriais metálicos: (a) stent e (b) grampo para aneurisma.



Fonte: Chen et al. (2015)

Os materiais derivados de organismos vivos são denominados biomateriais naturais (ZHANG et al., 2013). Os ossos, pele, tendões, córnea, nervos, músculos e sangue fazem parte desse grupo (ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013). Por serem originários de seres vivos, os biomateriais naturais apresentam como vantagens serem atóxicos, possuírem propriedades mecânicas mais próximas às propriedades do órgão ou tecido reparado ou ainda serem naturalmente degradados. No entanto, o hospedeiro pode desencadear uma reação imunológica se reconhecer o implante como um corpo estranho, outras desvantagens são a alta variabilidade das propriedades e terem a manipulação mais difícil quando comparado aos materiais sintéticos devido a sua complexidade biológica (ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013).

O outro grupo de biomateriais são os de origem sintética, aqueles que são manipulados para apresentarem propriedades específicas (ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013). Como mencionado anteriormente biomateriais sintéticos podem ser classificados em quatro categorias: metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos.

Os polímeros são facilmente degradados o que pode ser considerado vantagem caso o tempo de uso seja curto, por exemplo, na liberação de medicamentos, porém para casos que demandem mais tempo essa característica pode se tornar indesejável. Essa propriedade também é desfavorável durante o processo de esterilização, pois temperaturas elevadas, umidade e radiação podem alterar as propriedades do biopolímero. A facilidade no processamento e baixo módulo de elasticidade são vantagens em relação aos metais e cerâmicas. Os polímeros são encontrados em vários produtos biomédicos: lentes

intraoculares, próteses mamárias e como peças em próteses mais complexas, como as de quadril e joelho (ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013).

Os biomateriais cerâmicos são sintetizados a partir de compostos inorgânicos, como os óxidos metálicos. Apresentam excelente biocompatibilidade, resistência à corrosão e ao desgaste, porém possuem elevado módulo de elasticidade (200 – 400 GPa), e são muito frágeis (HENCH; WILSON, 1993). Como exemplo, se pode citar a zircônia que apresenta excelentes propriedades mecânicas, materiais produzidos a partir do carbono, além de hidroxiapatita e tricálcio fosfato, que por serem quimicamente semelhantes ao tecido ósseo promovem uma melhor osseointegração (ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013).

Os metais passaram a ganhar mais espaço na recuperação de funções corporais após o final da Revolução Industrial, na segunda metade do século 19, quando sua produção se tornou maior com o desenvolvimento de novas ligas. Simultaneamente, ao aumento da produção de metais, foi desenvolvida a técnica de cirurgia asséptica, por Joseph Lister em 1860, que diminuiu os casos de infecção pós-operatórios, permitindo que aumentasse a eficiência de materiais implantados (CHEN, 2015). As características essenciais para possibilitar que as ligas sejam usadas em implantes, como biocompatibilidade, resistência à corrosão e propriedades mecânicas adequadas, restringem o número de opções em quatro grandes grupos: as ligas de aço inoxidável, as ligas a base de cobalto e cromo, o titânio e suas ligas e um quarto grupo formado por outros metais, como magnésio e níquel (CHEN, 2015; ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013). Dentre os biomateriais metálicos se destaca o grupo do titânio e suas ligas, devido a um excelente conjunto de propriedades de volume, como resistências a fratura e à fadiga, baixo módulo de elasticidade, quando comparado a outros metais, excelente biocompatibilidade, resistência à corrosão e baixa densidade.

Os materiais biomédicos ainda podem ser formados pela união de dois ou mais materiais, originando um novo biomaterial com propriedades intermediárias as dos materiais que os formam. Os compósitos podem ser utilizados, por exemplo, na cimentação de ossos, em implantes dentários ou ortopédicos (ALI; ALMAATOQ; MOHAMED, 2013).

O prefixo “bio” que distingue esse grupo dos demais materiais se refere a uma propriedade essencial: a biocompatibilidade, isto é, o material não deve causar qualquer efeito nocivo ao organismo (SAINI, 2015). Porém existe uma tolerância em relação à nocividade, dependendo do local e da aplicação, por exemplo, em material usado em uma cirurgia ortopédica pode não apresentar as mesmas exigências para um caso cardiovascular. A biocompatibilidade pode ser classificada em relação à morte de células (citotoxicidade), a metagênese, a formação de câncer, a respostas imunológicas e alérgicas e a coagulação do

sangue. Não apenas as relações químicas e fisiológicas, como também a geometria influencia na citotoxicidade (CHEN, 2015; EISENBARTH, 2004).

Li et al. (2010) compararam a citotoxicidade de alguns metais amplamente utilizados em ligas para o uso biomédico e constataram que havia nocividade em alguns elementos quando se encontravam na forma de pó, porém quando eram analisados na forma de chapas essa característica não era notada, conferindo biocompatibilidade ao material.

A nocividade não é única resposta do tecido estudada, o material pode apresentar outras respostas biológicas que facilitam a recuperação do organismo. Hench e Wilson (1993 apud ESCADA, 2009) classificam os biomateriais em relação a estas respostas em:

a) Bioinertes: esses materiais não provocam nenhuma reação do tecido em contato, porém, normalmente, esses materiais são envolvidos por uma capa fibrosa que separa o tecido do implante.

b) Bioativos: diferentemente dos bioinertes, existem reações biofísicas e bioquímicas que favorecem a atividade celular no local, não formando o envoltório fibroso. Quando em contato com o tecido ósseo provoca o fenômeno da osseointegração, ou seja, ocorre o recobrimento do implante por células ósseas e o seu posterior desenvolvimento.

c) Bioabsorvíveis: as células do organismo são capazes de fagocitar o material.

d) Biodegradáveis: são materiais degradados pelo organismo gerando resíduos atóxicos.

Além da biocompatibilidade, a resistência a corrosão e propriedades mecânicas adequadas são de vital importância. A primeira está intimamente ligada a não toxicidade do material, pois impede que haja a liberação de íons no organismo causando reações adversas. Em relação às propriedades mecânicas, é necessária resistência ao desgaste e à fratura adequada à função e ao projeto do produto final, além de resistência à fadiga elevada. Em algumas situações, quando existe contato direto do material com o tecido ósseo, é de grande interesse que as diferenças entre os módulos de elasticidade do tecido e do implante sejam o mais próximo possível, evitando o efeito *stress shielding*, que ocorre quando os esforços não são bem distribuídos entre o osso e o implante, impedindo o crescimento ósseo na interface, podendo em alguns casos levar a perda da prótese.

Após certa estabilização de quais seriam as melhores propriedades de volume para um biomaterial, passou-se a estudar como modificar a superfície com o objetivo de melhorar a interação tecido/implante. No caso dos biometais, mais especificamente, quando aplicados na reparação de tecidos ósseos, busca-se se obter uma osseointegração mais eficaz. Deste modo, são pesquisadas formas de alterar a topografia do implante, por meio de métodos físicos, mecânicos e químicos; e de alterar a composição da superfície, com a adição de materiais que

induzam o crescimento ósseo ou evitem situações adversas, como inflamações e infecções (GEETHA et al. 2009; BAGNO; DIBELLO, 2004; KULKARNI et al., 2014).

2.2 TITÂNIO E SUAS LIGAS

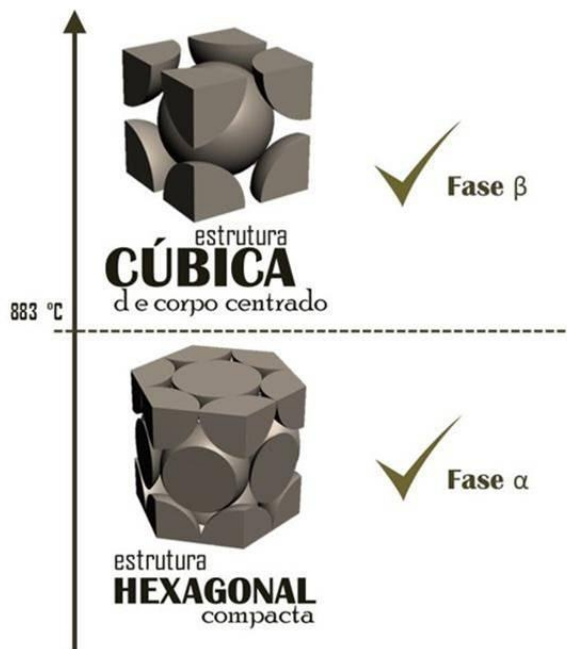
Apesar de não ser encontrado no corpo humano e não apresentar papel biológico, o titânio não é tóxico (CHEN et al., 2015). Essa característica é fundamental ao seu uso biomédico, somada à excelente resistência à corrosão, propriedades mecânicas adequadas e baixa densidade, tornou-o um dos mais importantes biomateriais estudados.

O titânio foi descoberto em 1791, em meio à revolução industrial e avanço da indústria metalúrgica por dois pesquisadores. O pastor e mineralogista inglês William Gregor, realizando pesquisas no vale de Manaccan, isolou de um óxido (ilmenita) um elemento ainda desconhecido, descrevendo e o denominando de Manaccanite. Naquele mesmo ano, o químico alemão Martin Klaproth estudando outro óxido (rutilo), conseguiu isolar um elemento e acreditando ser desconhecido, o denominou de titânio. Mais tarde, concluiu-se que os dois novos elementos eram, na verdade, o mesmo (LEYENS; PETERS, 2003; LÜTJERING; WILLIAMS, 2007).

Em 1940, foi desenvolvido, por William Kroll, um processo eficaz de se obter o titânio na sua forma pura, a partir do rutilo. O fato de ser muito reativo dificulta sua obtenção, tornando-o um metal relativamente caro, quando comparado a outros utilizados para o mesmo fim, como os aços, apesar de ser o quarto metal mais abundante na crosta terrestre, atrás do alumínio, ferro e magnésio (LEYENS; PETERS, 2003; LÜTJERING; WILLIAMS, 2007).

O titânio é alotrópico, ou seja, apresenta uma mudança da estrutura, que ocorre, normalmente, por meio de tratamentos térmicos, porém tratamentos mecânicos também podem ser utilizados. No caso do titânio há uma mudança da estrutura hexagonal (HC) para uma estrutura cúbica de corpo centrado (CCC), influenciando várias propriedades, como módulo de elasticidade e resistência à tração (Figura 3). Até a 883 °C o titânio se organiza em uma estrutura hexagonal compacta (HC), acima dessa temperatura os átomos se ordenam em uma estrutura cúbica de corpo centrada (CCC). A fase hexagonal compacta é denominada de fase alfa (fase α), enquanto que a estrutura cúbica de corpo centrado recebe o nome de fase beta (fase β) (CHEN et al., 2015; LONG; RACK, 1998).

Figura 3 - O titânio é um elemento alotrópico, apresentando estrutura hexagonal compacta (HC) e, acima de 883 °C, estrutura cúbica de corpo centrado (CCC).

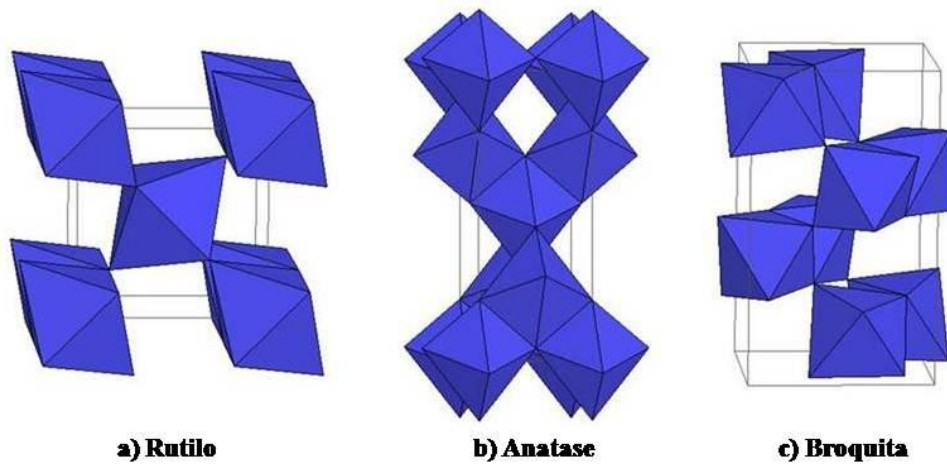


Fonte: Autor

A resistência à corrosão está relacionada à biocompatibilidade do titânio, devido à formação espontânea de uma camada passiva na superfície do metal, que impede a liberação de íons de Ti para o meio, mesmo quando exposto ao fluido corporal. A formação dessa camada de óxido estável (TiO_2), com espessura entre 2 e 10 nm, ocorre rapidamente, da ordem de 10^{-9} s, pois o Ti é altamente reativo (CHEN et al., 2015).

A camada passiva de dióxido de titânio (TiO_2) é amorfa, porém pode passar por transformação, quando exposta a temperaturas superiores a 400°C, e se tornar cristalina de forma irreversível. Existem três fases cristalinas possíveis (polimorfismo): rutilo, anatase e broquiita (Figura 4). O rutilo apresenta uma estrutura tetragonal, e é a fase mais comum, por este motivo é a forma mais estudada. Estudos *in vitro* revelaram que a anatase (tetragonal) favorece o crescimento das células, portanto tem uma aplicação importante em biomateriais. A forma mais rara encontrada naturalmente é a broquiita que apresenta uma estrutura ortorrômbica. (REGONINI et al., 2013)

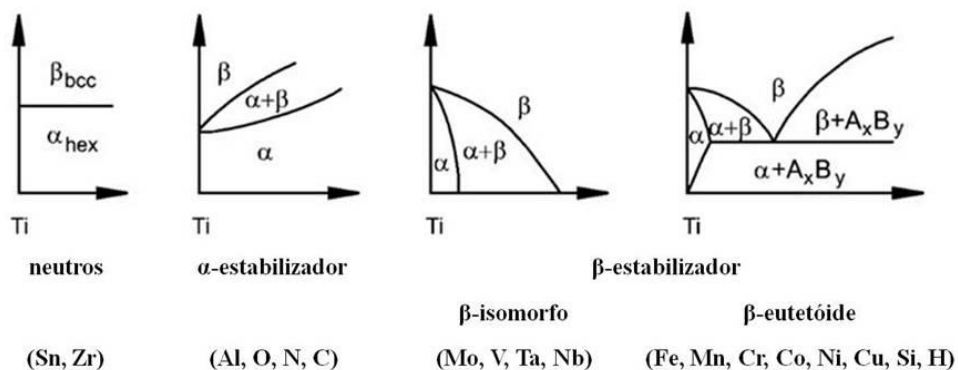
Figura 4 - Estruturas cristalinas do TiO_2 : (a) rutilo (tetragonal), (b) anatase (tetragonal) (c) broquita (ortorrômbica).



Fonte: adaptado de Regonini et al. (2013)

Desta forma, elementos de liga são utilizados para estabilizar a fase desejada, juntamente, com os tratamentos térmicos e/ou mecânicos. Além disto, eles modificam outras propriedades, como resistência a corrosão e biocompatibilidade. Os elementos de ligas são classificados em três categorias, segundo a estrutura que induzem: os neutros, os α -estabilizadores e os β -estabilizadores (Figura 5) (LEYENS; PETERS, 2003; LONG; RACK, 1998; SHAH et al.; 2016). Os elementos α -estabilizadores elevam a temperatura de transformação da estrutura HC para CCC, enquanto os elementos β -estabilizadores produzem um efeito contrário. Alumínio e oxigênio são os α -estabilizadores mais importantes, formando as ligas mais utilizadas. Os elementos estabilizadores da fase β são subdivididos em dois grupos: β -eutéticos e β -isomorfos, que apresentam maior solubilidade. O uso de α -estabilizadores ou β -isomorfos formam uma região onde as duas fases (α e β) são presentes (LEYENS e PETERS, 2003).

Figura 5 - Influência dos elementos de na formação das fases de ligas de Ti.



Fonte: adaptado de Leyens; Peters (2003).

Quando não há tempo suficiente para total transformação da fase β em α , devido ao resfriamento rápido, podem surgir fases metaestáveis, com propriedades intermediárias as duas fases originais. Outra forma de surgimento dessas fases é por meio de tratamentos mecânicos, que levam a uma distorção da estrutura. Essas fases são denominadas α' , α'' e ω . As duas primeiras apresentam módulos de elasticidade e resistência à fratura com valores intermediários as fases α e β , sendo que a fase α' mais resistente, devido sua maior semelhança com a fase α . O resfriamento rápido de ligas com alta concentração de β -estabilizadores, além do envelhecimento e deformação mecânica a frio, podem induzir a formação da fase ω , que não é recomendada. A presença da fase ω em ligas utilizadas na fabricação de implantes, resulta no aumento do módulo de elasticidade do material (PRABHA et al, 2011, SUN et al., 2011, BEHERA et al., 2013).

As ligas de titânio podem ser classificadas em relação às fases presentes a temperatura ambiente, segundo Long e Rack (1998) há cinco grupos: ligas dos tipos α , quase- α , $\alpha+\beta$, β metaestável e β . As ligas do tipo α e quase- α apresentam excelente resistência à corrosão, as ligas comercialmente puras são exemplos de ligas do tipo α . As ligas do tipo β exibem boa conformabilidade, e a excelente combinação de baixo módulo de elasticidade e ótima resistência a corrosão. As ligas que apresentam entre 10 e 20% de fase β são classificadas como $\alpha+\beta$ e possuem propriedades intermediárias em relação às ligas do tipo α e β , como exemplo, pertence a esse grupo a liga mais comercializada, Ti6Al4V (BEHERA et al., 2013; LEYENS; PETERS, 2003; LONG; RACK, 1998; SHAH et al.; 2016; CHEN et al., 2015).

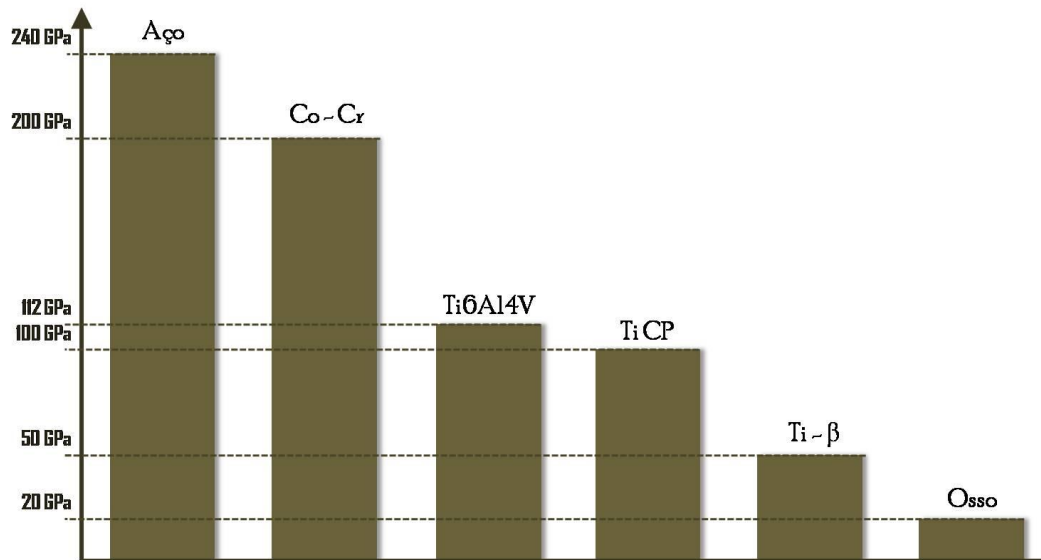
Algumas propriedades mecânicas são importantes quando o metal é empregado na fabricação de implantes de substituição de tecidos duros, duas propriedades se destacam: resistência a fadiga e módulo de elasticidade.

Quando existe uma diferença muito grande entre o módulo de elasticidade do implante e o osso, os esforços gerados naturalmente pelo corpo não são distribuídos igualmente entre o osso e o metal e, como consequência, pode haver a atrofia do tecido ósseo, ocasionando a perda do implante, esse fenômeno é conhecido como *stress shielding* (NIIOMI; NAKAI, 1998).

Os ossos têm módulo de elasticidade inferiores a 30 GPa, por exemplo, o módulo de elasticidade do fêmur é 17 GPa, enquanto que os ossos da cervical têm valores menores que 1 GPa. Logo, para minimizar o efeito *stress shielding* deve se utilizar materiais com módulo de elasticidade baixo. Dentre os biomateriais metálicos mais empregados, os aços inoxidáveis têm módulo de elasticidade em torno de 240 GPa, as ligas de Co-Cr exibem valores com cerca de 200 GPa, enquanto o titânio e suas ligas têm módulos de elasticidade inferiores a 100 GPa

(Figura 6). Entre as ligas de titânio, as ligas do tipo β apresentam resultados ainda melhores, com módulo em torno de 50 GPa, isso se deve a estrutura do tipo CCC, que apresenta mais planos e direções de escorregamento quando comparada com a fase α (KATTI, 2004; GEETHA et al., 2009; CHEN et al., 2015).

Figura 6 - Módulo de elasticidade dos três principais grupos de biomateriais metálicos.



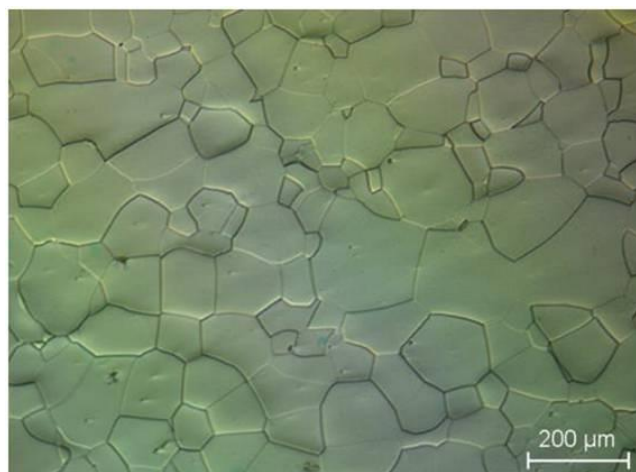
Fonte: Autor

A resistência à fadiga é outra importante propriedade mecânica, pois em decorrência dela os implantes podem falhar dentro da faixa de esforços previstos. Ligas de titânio do tipo β são menos resistentes em comparação as ligas do tipo α e $\alpha+\beta$, porém quando se observa a relação resistência à fadiga/módulo de elasticidade, as ligas do tipo β são superiores aos outros dois tipos. Além da estrutura, a condição da superfície influencia na resistência a fadiga do material, por exemplo, há uma redução de 40% da resistência, quando existem ranhuras na superfície de implantes de ligas do tipo α ou $\alpha+\beta$. Entretanto, superfícies irregulares são mais vantajosas para a interação implante/tecido, favorecendo o crescimento celular. Portanto, é interessante que o uso das modificações de superfície seja usado com moderação e em locais relevantes para o sucesso da reparação do tecido (CHEN et al., 2015; LONG e RACK, 1998).

2.2.1 Estudos de ligas de titânio para uso biomédico

A liga mais utilizada para a fabricação de implantes é a Ti6Al4V, porém devido à toxicidade dos elementos de liga, o alumínio vem sendo relacionado ao mal de Alzheimer, e o vanádio vinculado a inflamação dos órgãos, e seu módulo de elasticidade, novas ligas, livres desses elementos estão sendo estudadas buscando módulos de elasticidade mais próximos ao do tecido ósseo, nesse sentido destacam-se o Mo, Nb, Ta, Zr e Sn por serem β -estabilizadores e não-tóxicos (XU et al. 2008). O nióbio apresenta excelente biocompatibilidade e resistência à corrosão, enquanto o molibdênio, apesar de seu uso ainda ser controverso, tem propriedades mecânicas compatíveis a aplicação biomédica, boa citotoxicidade e é um forte estabilizador da fase β em comparação aos outros elementos, concentrações maiores que 10% peso estabilizam a fase β (CHELARIU et al. 2014; NEACSU et al. 2015). Várias ligas do sistema Ti-Mo e Ti-Nb vem sendo estudadas, como por exemplo, as ligas Ti7,5Mo e Ti15Mo que não apresentaram citotoxicidade e interferência negativa no crescimento celular (CHELARIU et al. 2014; NEACSU et al. 2015; CHAVES et al., 2016). O nióbio foi estudado como elemento de liga para substituição das ligas do sistema Ti-Ni por Kim et al. (2006) e outros pesquisadores que constataram que até concentrações de 15% em massa de Nb, as ligas apresentavam fase α' , entre 15 e 35% estabilizava-se a fase α'' e acima dessa concentração a fase β se torna dominante (Figura 7) (CHELARIU et al. 2014). Além de excelente biocompatibilidade e resistência à corrosão o óxido formado nas ligas Ti-Nb agiu como um ótimo suporte para adesão e proliferação celular sem nenhuma resposta inflamatória (NEACSU et al. 2015).

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



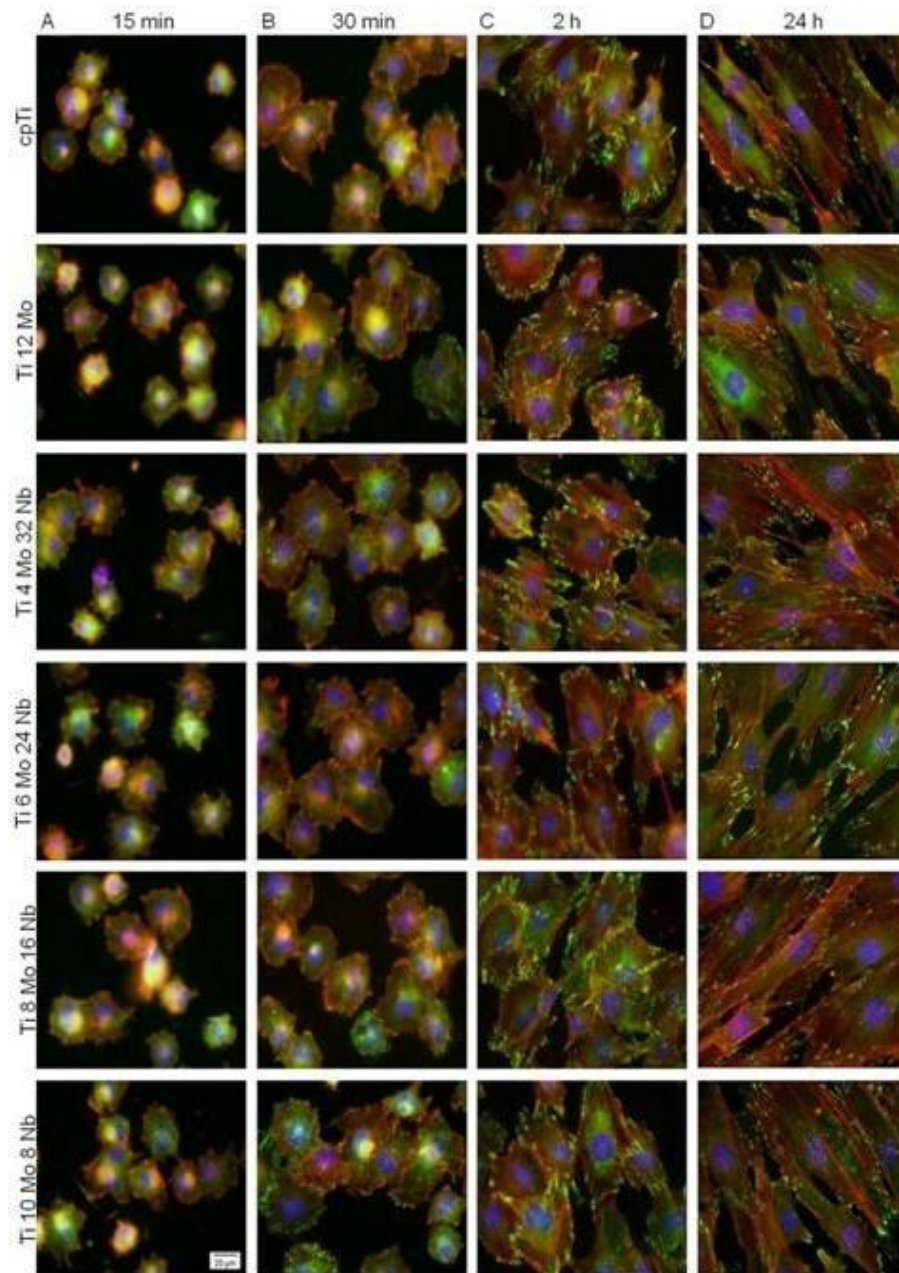
Fonte: Chelariu et al. (2014)

As ligas do sistema ternário Ti-Mo-Nb também foram estudadas por Xu et al. (2008). Os pesquisadores realizaram um estudo sobre as propriedades mecânicas e microestrutura das ligas Ti10Mo3Nb, Ti10Mo7Nb e Ti10Mo10Nb. Todas as ligas apresentaram grãos equiaxiais da fase β em uma matriz α , ocorrendo um aumento da fase β com o aumento do teor de nióbio. Esse resultado foi confirmado com a realização dos ensaios de dureza, sendo que houve uma diminuição nas magnitudes obtidas com o aumento da fase β e, conseqüentemente, com o aumento da concentração de Nb. As três ligas apresentam valores elevados de dureza Vickers (394 - 444) quando comparado com o titânio comercialmente puro (160) e valores de módulo de elasticidade reduzidos, entre 24,7 e 28,4 GPa, que diminuiu com o aumento de nióbio.

Almeida et al. (2014) e Chelariu et al. (2014) estudaram a resistência à corrosão de diferentes ligas de Ti-Mo-Nb. Ambos notaram um aumento da resistência à corrosão com o aumento da concentração de nióbio. Almeida et al. (2014) relacionou esse aumento a rede cristalina do TiO₂ com menor número de vacâncias, devido a presença de Nb, além de propor que uma liga com uma fase única apresenta melhor resistência a corrosão em razão da formação de um efeito galvânico entre as fases α e β . Entre as ligas estudadas, Ti12Mo13Nb e Ti10Mo20Nb, a que continha maior concentração de Nb exibiu maior quantidade de fase β e melhor resistência à corrosão. Chelariu et al. (2014) estudou as ligas Ti12Mo, Ti10Mo8Nb, Ti8Mo16Nb, Ti6Mo24Nb e Ti4Mo32Nb em meio salino. Todas as ligas após solubilização apresentaram fase β e com microestrutura equiaxial. Após testes de espectroscopia de impedância eletroquímica e microscopia de varredura constatou-se a formação de uma camada compacta de TiO₂. Apesar da resistência à corrosão aumentar com o aumento da concentração de nióbio existiu uma condição ótima, onde a camada de óxido formada é mais isolante, sendo mais difícil as reações de troca de elétrons, a condição seria entre 8 e 16% de Nb em peso.

Estudos *in vitro* foram realizados por Neacsu et al. (2015) nas ligas de tipo β : Ti12Mo, Ti4Mo32Nb, Ti6Mo24Nb, Ti8Mo12Nb e Ti10Mo8Nb. Os estudos foram realizados com células do tipo pré-osteoblastos, como resultado houve forte adesão e boa proliferação e diferenciação celular não havendo diferença significativa entre as ligas e o TiCP, não apresentando citotoxicidade e resposta inflamatória (Figura 8).

Figura 8 - Imagens de fluorescência de filamentos de actina (vermelho) e vinculin (verde) em células MC3T3-E1 pré-osteoblastos cultivadas em ligas do sistema Ti-Mo-Nb.



Fonte: Neacsu et al. (2015)

2.3 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE

Uma vez estabelecidas as melhores propriedades de volume para implantes metálicos, o alvo dos estudos se tornou os meios de modificação da superfície, buscando melhorar a interação tecido/implante. Segundo Bagno e Di Bello (2004) esta relação é influenciada pela composição e organização da camada de proteínas formadas na superfície do implante, que por sua vez é controlada pelas propriedades da superfície, como a energia de superfície e

molhabilidade (GEETHA et al. 2009; BAGNO; DI BELLO, 2004). Estas propriedades são dependentes das micro e nanotopografias e da composição da superfície (BAGNO; DI BELLO, 2004).

Alguns autores classificam as possíveis modificações de superfície em físicas, que incluem os tratamentos mecânicos, como usinagem, lixamento e polimento; químicas, por exemplo, ataques ácidos e alcalinos e métodos eletroquímicos; e bioquímicas (BAGNO; DI BELLO, 2004).

Por outro lado, Sobieszczyk (2010), Kulkarni et al. (2014) e Liu et al. (2014), dividem essas técnicas em quatro tipos, considerando os tratamentos mecânicos, um novo grupo de técnicas de modificação de superfícies, admitindo como métodos físicos, por exemplo, tratamentos de plasma e deposição física de vapor (PVD), nos quais não ocorrem reações químicas. Duan e Wang (2006) propõem a classificação exibida no quadro 1.

Quadro 1 – Classificação dos tratamentos de modificação de superfícies, segundo Duan e Wang (2006).

Grupos	Definição	Exemplos
Grupo 1	Adição de materiais com funções desejáveis.	Deposição física de vapor (VPD) <i>Plasma spray</i> Tratamento biomimético Imobilização de moléculas funcionais
Grupo 2	Modificação da superfície existente em composições e topografias desejáveis.	Implantação de íons Métodos eletroquímicos
Grupo 3	Remoção de material da superfície, com o objetivo de criar topografias específicas.	Usinagem Jateamento Ataque químico

Fonte: Autor

A oxidação anódica é uma excelente alternativa, pois cria uma nanotopografia, com a modificação da camada de óxido que naturalmente é formada pelo material do implante, gerando estruturas porosas e/ou tubulares (Figura 3), que, também, podem ser utilizadas como reservatório de medicamentos, favorecendo o crescimento celular e evitando respostas imunológicas (REGONINI et al., 2013).

2.4 TRATAMENTO DE SUPERÍCIE: OXIDAÇÃO ANÓDICA

2.4.1 Considerações gerais

A oxidação anódica é uma técnica eletroquímica que permite o crescimento estruturas nanométricas a partir do óxido de alguns metais, como alumínio, zircônio, estanho, titânio entre outros. Estas nanoestruturas permitem diversas aplicações, no caso do titânio e suas ligas, por exemplo, podem ser empregados em células solares, fotocatalisadores e implantes biomédicos (LIANG et al., 2011).

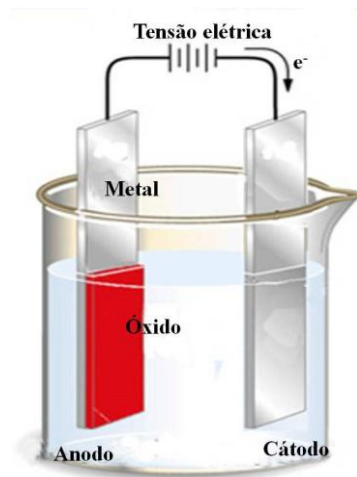
Esse item tem como objetivo apresentar o mecanismo de formação e crescimento destas nanoestruturas de dióxido de titânio e os fatores que influenciam este processo. Regonini e colaboradores fizeram uma excelente revisão sobre este tema no artigo “*A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes*”, em 2013, que será o eixo desse conteúdo. A modificação da superfície por esse processo se origina em estudos com alumínio, na década de 1950, e posteriormente é desenvolvida em outros metais, entre os quais se destaca o titânio, devido as suas aplicações. Portanto, em diversas ocasiões são apresentados conceitos elaborados a partir dos experimentos com alumínio para explicar os mecanismos no titânio.

Em 1953, Keller et al. apresentaram um estudo realizado com alumínio comercialmente puro (CP), no qual foi obtido um conjunto de estruturas compactas, com formato hexagonal contendo no seu interior um único poro, formada a partir da modificação da camada de óxido de alumínio por meio de anodização em solução ácida. Quatro décadas depois, a técnica foi otimizada por Masuda e Fukuda (1995), que obtiveram um filme poroso altamente ordenado de óxido de alumínio, com aspecto semelhante a um favo de mel, com diâmetro de 70 nm. Neste estudo, o alumínio CP foi anodizado em uma solução de ácido oxálico (0,3 mol/L) sob uma tensão de 40 V. Simultaneamente, durante esse período foi publicado o primeiro estudo como titânio CP, por Assefpour-Dezfuly e colaboradores (1984) e quinze anos depois foram publicados dois trabalhos que serviram de base para o desenvolvimento do método para o titânio e suas ligas, por Zwilling e coautores (1999, 1999 apud REGONINI et al., 2013), em que caracterizam a camada de óxido formada pelo tratamento da liga Ti6Al4V em eletrólito composto por ácido crômico (H₂CrO₄) e ácido fluorídrico (HF) . Outros metais, como zircônio, nióbio, vanádio, tântalo e ferro também vêm sendo pesquisados (REGONINI et al., 2013).

O processo de oxidação anódica consiste na aplicação de uma diferença de potencial elétrico entre a amostra (ânodo) e o contra-eletrodo, normalmente de platina, imersos em um

eletrólito (Figura 9). Desde os estudos de Assefpour-Dezfuly et al. (1984) são utilizados íons fluoreto na composição do eletrólito, devido sua capacidade de dissolver o dióxido de titânio (TiO_2), formado espontaneamente sobre o substrato. O filme óxido formado atua como uma barreira a migração de íons do metal, limitando seu crescimento, os íons fluoreto dissolvem parte dessa camada permitindo que haja migração de íons Ti^{4+} com a aplicação da tensão.

Figura 9 – Representação de uma célula eletrolítica utilizada durante a oxidação anódica.



Fonte: adaptado de Regonini et al. (2013)

Segundo Regonini et al. (2013) e Mohapatra et al. (2007), a reação que ocorre no ânodo é representada na equação (1). Simultaneamente, ocorre a dissociação da água, que é necessária para o processo, e a rápida recombinação dos íons Ti^{4+} com OH^- e O^{2-} , representado, de forma simplificada, nas equações (2) e (3).



Há um gradiente de hidratação do óxido enquanto ele é formado, influenciado pela tensão, sendo ela diretamente proporcional a incorporação de água. Porém se considera que o óxido formado é composto por duas camadas, uma interna, próxima a interface metal/óxido e outra externa, interface óxido/eletrólito (TAVEIRA et al., 2005; REGONINI et al., 2013). A camada interna é representada pelo óxido TiO_2 , desidratado, e a externa, hidratada, por $\text{Ti}(\text{OH})_4$. Posteriormente a camada externa libera a água pela reação de condensação (Equação 4).



Enquanto essas reações ocorrem no ânodo, no catodo ocorre à liberação de hidrogênio, de acordo com a equação (5).



A equação (6) resume a formação de dióxido de titânio (TiO_2):



Como comentado anteriormente, os íons fluoreto tem como função dissolver parte do óxido formado, equações (7) e (8), além de também se combinarem com parte dos íons Ti^{4+} , (Equação 9) formando o complexo $[TiF_6]^{2-}$.

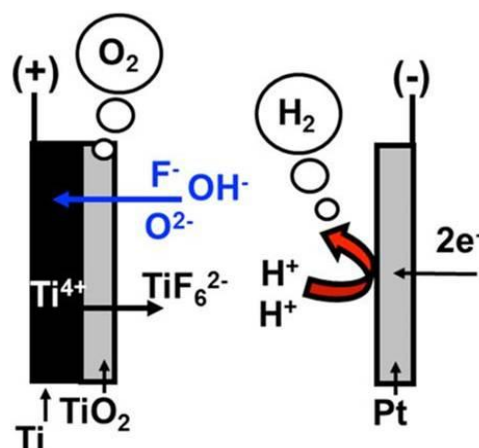


Essa oposição entre dissolução e formação da camada de óxido é a principal razão do desenvolvimento de nanoporos e nanotubos. Além da formação e dissolução do filme óxido, também pode ocorrer à formação de oxigênio no ânodo (Equação 10), que poderá influenciar na formação das nanoestruturas.



Uma representação dos processos químicos que ocorrem durante a oxidação anódica do Ti é apresentada na figura 10.

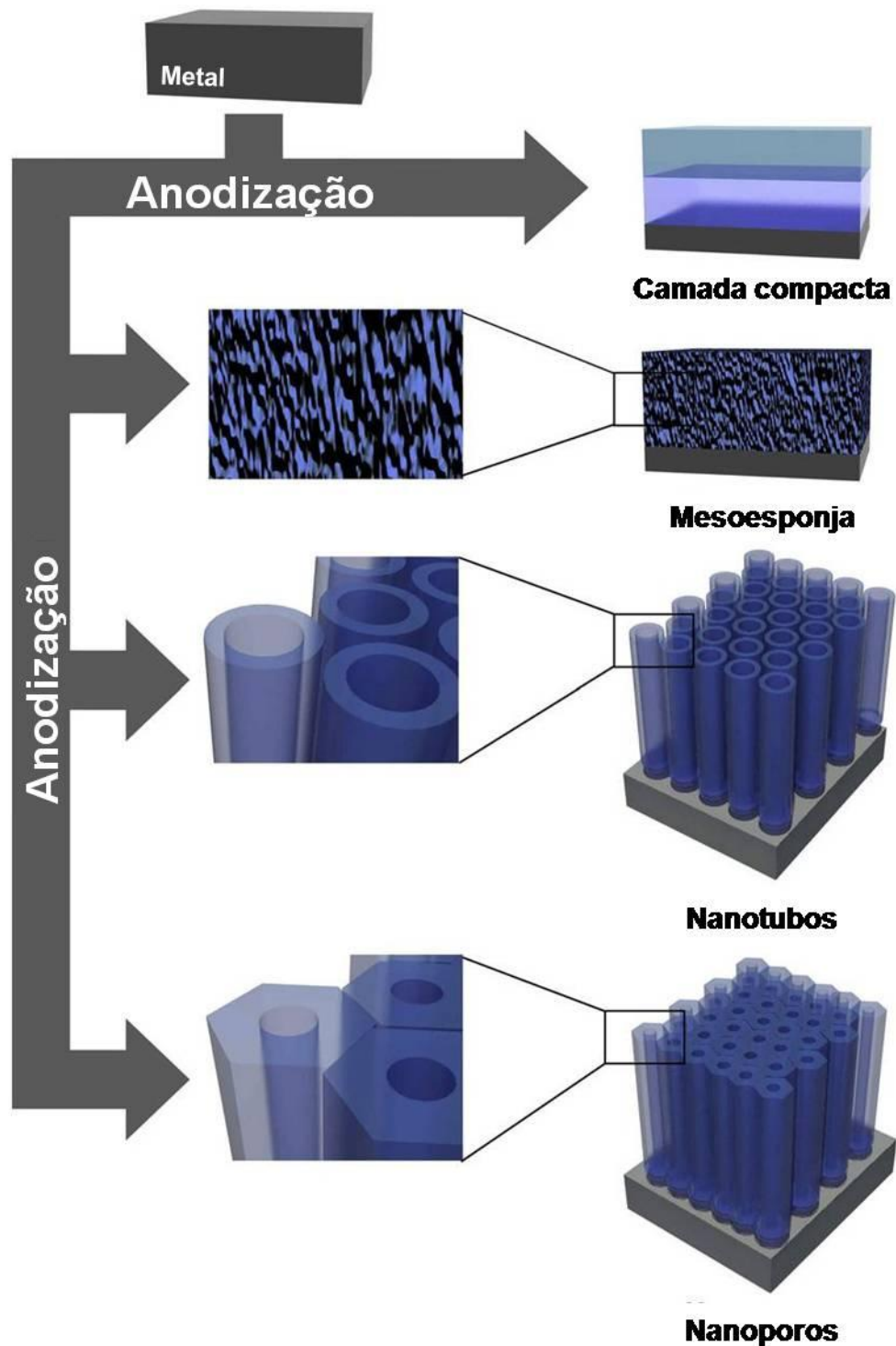
Figura 10 – Representação dos processos químicos que ocorrem durante a oxidação anódica do Ti.



Fonte: Regonini et al. (2013).

Esse processo leva a formação de diversas estruturas desde camadas porosas até nanotubos ordenados (figura 11) dependendo da composição do material tratado, do potencial, do eletrólito, entre outros parâmetros (KOLWALSKI; KIM; SCHMUKI, 2013).

Figura 11 - Diferentes morfologias da camada de óxido resultante de oxidação anódica sob diferentes parâmetros.

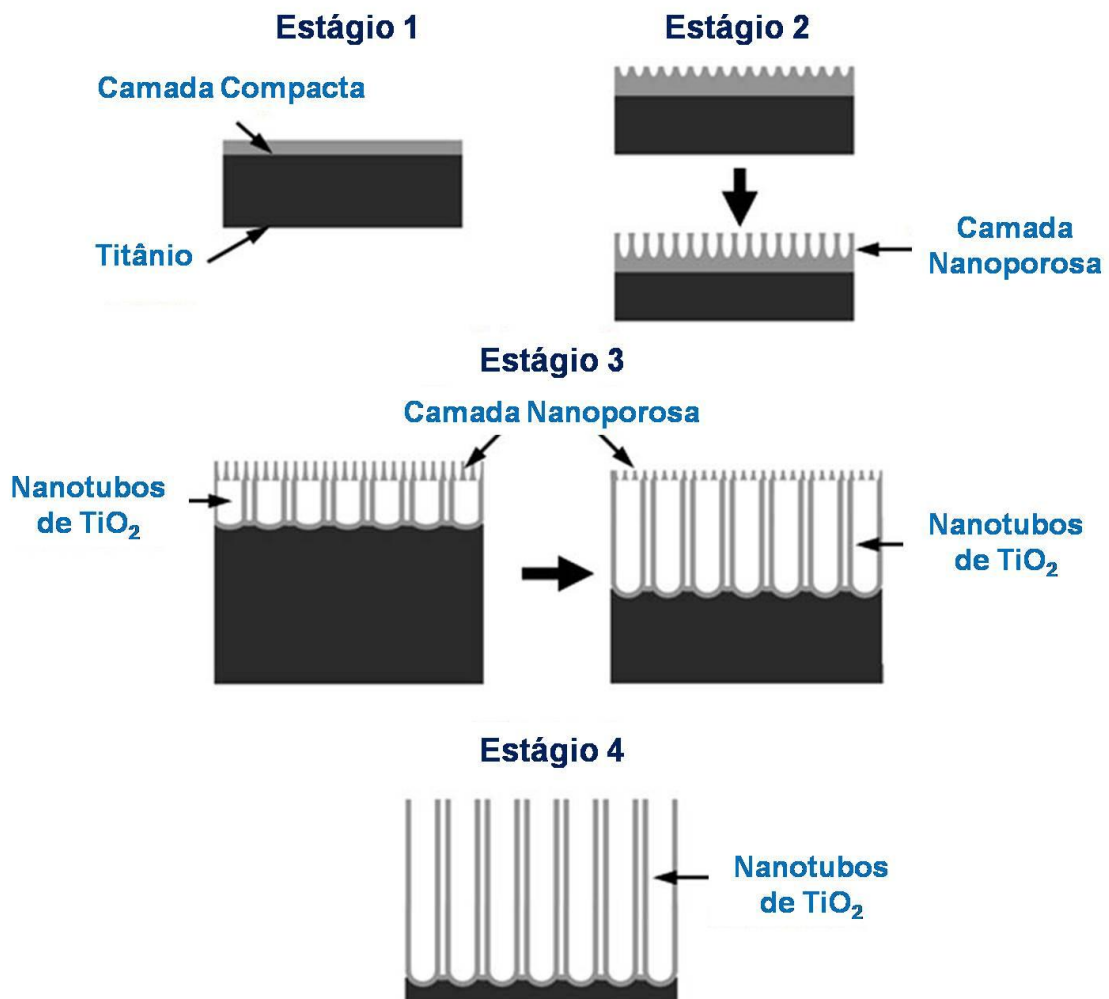


Fonte: adaptado de Kolwalski; Kim; Schmuki (2013)

De acordo com Crowford e Chawla (2009), o crescimento de nanoestruturas ocorre em 4 estágios (Figura 12). No inicial (Estágio 1) a anodização é caracterizada pela grande diminuição da densidade de corrente com o tempo, devido à formação de uma camada de óxido densa pela dissolução de titânio. O estágio 2 é caracterizado pela formação de

nanoporos através da superfície da camada de TiO_2 (Figura 12). Como os nanoporos continuam crescendo dentro da camada, existe uma transição abrupta de nanoporos para nanotubos sendo o Estágio 3 caracterizado pela formação de uma bicamada. A camada externa formada por nanoporos e a camada interna formada por nanotubos. O estágio 4 é formado pela completa dissolução da camada porosa e da compacta, originando a formação de nanotubos de TiO_2 altamente ordenados.

Figura 12 - Ilustração sobre o processo de formação de camadas porosas e nanotubos.



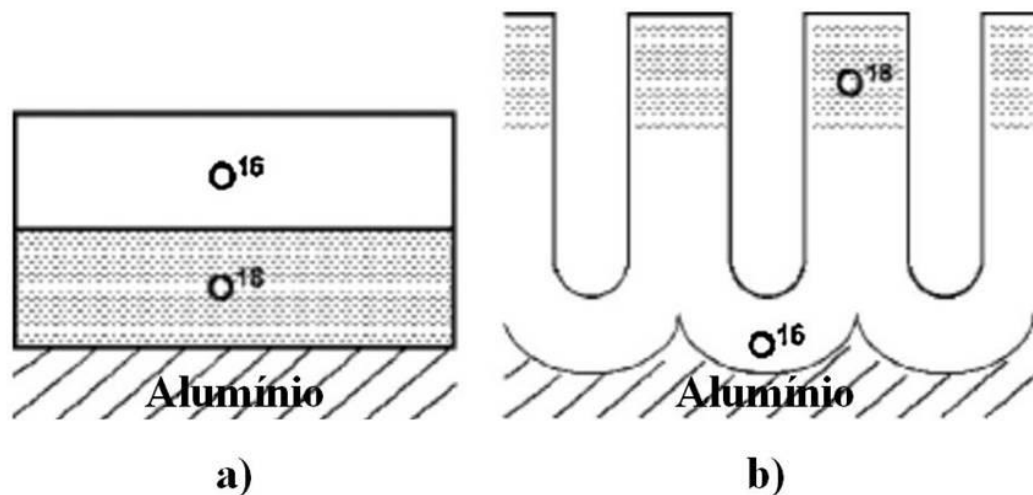
Fonte: Adaptado de Crowford; Chawla (2009)

Modelos mais complexos que explicam melhor a formação de nanoestruturas foram desenvolvidos como consequência dos estudos em alumínio, subsequentemente, utilizados para o titânio e suas ligas (REGONINI et al., 2013).

Experimentos posteriores aos citados no início desta seção, ainda com alumínio, identificaram que a formação do óxido não ocorria apenas próximo na interface óxido/eletrólito. Neste estudo amostras de alumínio foram oxidadas em um eletrólito rico em

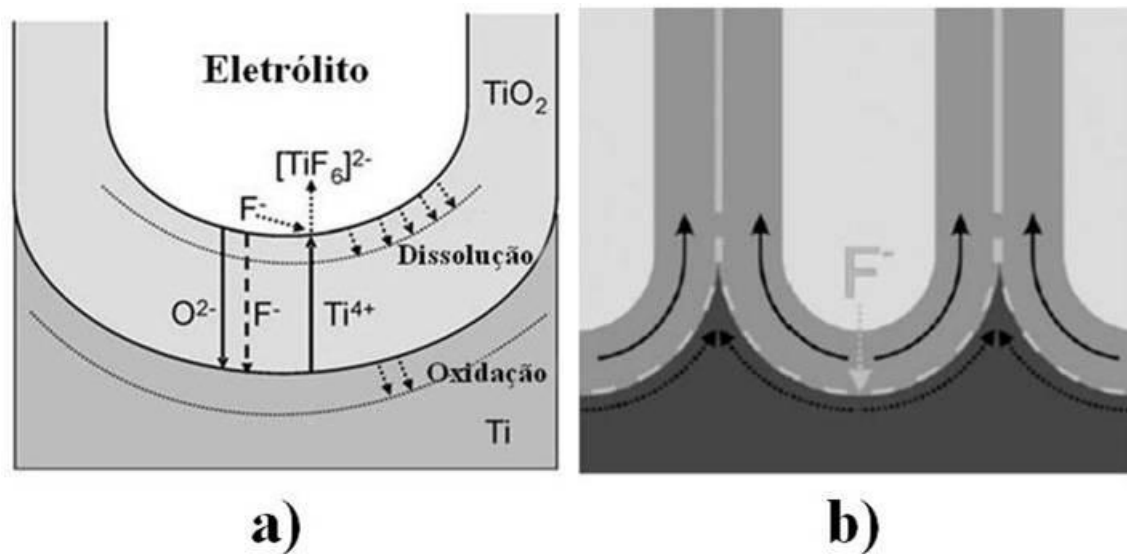
O^{18} com o objetivo de formar um filme denso, em sequência, foi realizada nova anodização, porém agora em um meio livre de O^{18} , para o crescimento de estruturas porosas. Quando analisadas as amostras que passaram pelos dois tratamentos, se observou que a primeira camada, rica em O^{18} , se encontrava no topo da camada porosa, ou seja, a formação da nova camada, rica em O^{16} , ocorreu junto ao substrato, sob o antigo filme (Figura 13) (SIEJKA et al., 1977). Outros estudos realizados com alumínio dopado com tungstênio (W) evidenciaram a presença de ripas de óxido de tungstênio penetrando a alumina, nas paredes dos poros, sem rompê-la (IGLESIAS-RUBIANES et al., 2002). Esta arquitetura das nanoestruturas pode ser explicada pela expansão do óxido, que causa um deslocamento do filme formado, se acumulando em algumas regiões, onde se formará a parede do tubo (Figura 14) (JESSENSKY et al., 1998; LI et al., 1998; REGONINI et al., 2013), como ocorre a formação de cadeias de montanhas no encontro de duas placas tectônicas. O crescimento de nanotubos de TiO_2 pode ser explicado de forma análoga. Estes mecanismos explicam a ocorrência de estruturas conectadas, poros em um filme óxido.

Figura 13 - Representação dos resultados obtidos por Siejka et al. (1977). Formação de um filme (a) denso e (b) poroso, após anodização em meio contendo O^{18} , seguido de anodização em eletrólito livre de O^{18} .



Fonte: Adaptado de Regonini et al. (2013)

Figura 14 – Representação dos (a) processos de dissolução e formação do TiO_2 em meios contendo íons F^- e do (b) processo de crescimento dos nanotubos.



Fonte: adaptado de Macak et al. (2007); Regonini et al. (2013)

O crescimento de nanoestruturas é influenciado por diversos fatores, com o tempo de anodização, temperatura, eletrólito e tensão. Outros fatores, como a resistência do eletrólito e processos de difusão, muitas vezes não são considerados, devido à dificuldade de controle ou por serem menos decisivos ao crescimento dos nanotubos (REGONINI et al., 2013; MACAK et al., 2007).

2.4.2 Eletrólito

Os eletrólitos podem ser classificados basicamente segundo a sua natureza em dois tipos: aquosos e orgânicos. A concentração dos íons F^- precisa assegurar o crescimento das nanoestruturas, portanto, é indispensável encontrar um valor mínimo para que isso ocorra.

As soluções de ácido crômico com fluoreto de amônio ou ácido fluorídrico são exemplos de eletrólitos aquosos. Esses meios são mais agressivos para o dióxido de titânio (TiO_2), o que resulta em camadas muito espessas. Por exemplo, o uso de HF produz filme com até $0,5 \mu\text{m}$ de espessura. Uma alternativa viável é o uso de soluções contendo sais de fluoreto, por exemplo, $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaF}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{NH}_4\text{F}$. Com esses eletrólitos é possível obter filmes até oito vezes mais espessos (REGONINI et al., 2013).

Ao se utilizar meios orgânicos, o movimento e a troca de íons na superfície do substrato são mais lentos, o oxigênio necessário para a formação do dióxido de titânio (TiO_2) será dificultado, devido às ligações oxigênio/carbono serem mais energéticas quando comparadas

com as ligações das moléculas de água, sendo nesse caso necessária uma quantidade mínima de água na solução (KELLY et al., 1989; REGONINI et al., 2013). A dissolução ocorre em uma taxa menor, possibilitando um crescimento superior da camada de óxido, podendo atingir espessuras de até 1000 μm , como descrito por Paulouse e colaboradores (2007 apud REGONINI et al., 2013). Por apresentar uma dissolução mais branda costuma-se encontrar uma camada de óxido sobre os nanotubos, que pode ser removida, caso interfira na aplicação, com a utilização de banho ultrassônico (REGONINI et al., 2013).

O raio do cátion do sal de fluoreto também interfere na taxa de crescimento e no comprimento dos nanocanais. Os cátions maiores favorecem a formação dos tubos, por inibirem algum efeito estérico, facilitando a migração de íons (REGONINI et al., 2013; SHANKAR et al., 2007).

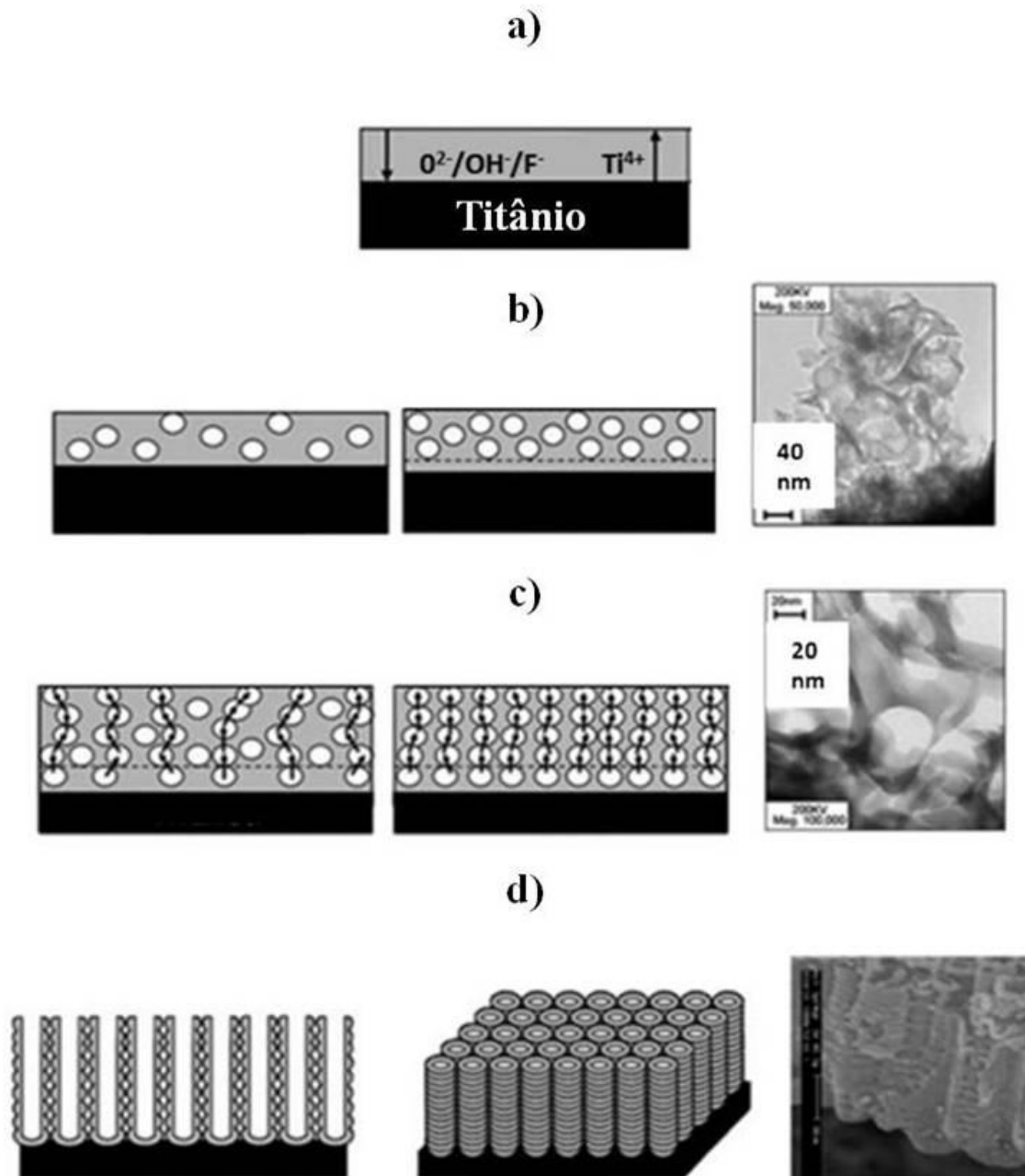
O “envelhecimento” da solução também é um parâmetro que deve ser destacado, segundo Regonini et al. (2013). Nesse caso, soluções reaproveitadas apresentam uma maior condutividade, por ter uma maior concentração de TiF_6^{2-} , que favorece a formação das nanoestruturas (LI et al., 2009).

A quantidade de água no eletrólito também pode afetar a morfologia da camada de óxido, devido à formação de oxigênio no ânodo. A evolução de oxigênio é verificada tanto em eletrólitos aquosos como orgânico, sendo mais intensas no primeiro. A presença oxigênio pode afetar a morfologia dos nanotubos, sendo um dos fatores responsáveis pelo aspecto ondulado da parede dos tubos e pela presença de “costelas”, a tensão aplicada seria outro importante parâmetro relacionado a esta morfologia (REGONINI et al., 2013). Em processos muito rápidos não haveria tempo suficiente para dissolução do óxido que separa os nanotubos, gerando o aspecto irregular da parede, e a evolução de oxigênio aprisionadas no óxido contribuiriam com essa textura (Figura 15) (JAROENWORALUCK et al., 2007; JAROENWORALUCK et al., 2008; REGONINI et al., 2013), a evolução de gás também pode influenciar na formação de camadas porosas.

O estudo do crescimento de nanotubos em filmes óxidos pode ser dividido em quatro gerações em relação ao tipo de eletrólito usado. A primeira geração compreende o uso de soluções aquosas de ácido fluorídrico, onde são obtidos nanotubos curtos, sem grande organização (Figura 16 (a)). A partir de soluções aquosas com sais de fluoreto, são formados tubos mais longos, acima de 5 μm , e ordenados, esta é definida como a segunda geração (Figura 16 (b)). Na terceira e quarta gerações se passa a utilizar soluções orgânicas com pouca água e sais de fluoreto, obtendo nanotubos ordenados (3ª geração) (Figura 16 (c)) e altamente

ordenados (4ª geração) (Figura 16 (d)), e extremamente longos, atingindo até 1000 μm de comprimento (REGONINI et al., 2013).

Figura 15 - Representação da formação de nanotubos de TiO_2 com aspecto da parede ondulado: (a) reações na interface óxido/metal; (b) formação de bolhas de O_2 ; (c) união das bolhas pela dissolução do TiO_2 ; (d) formação de nanotubos.

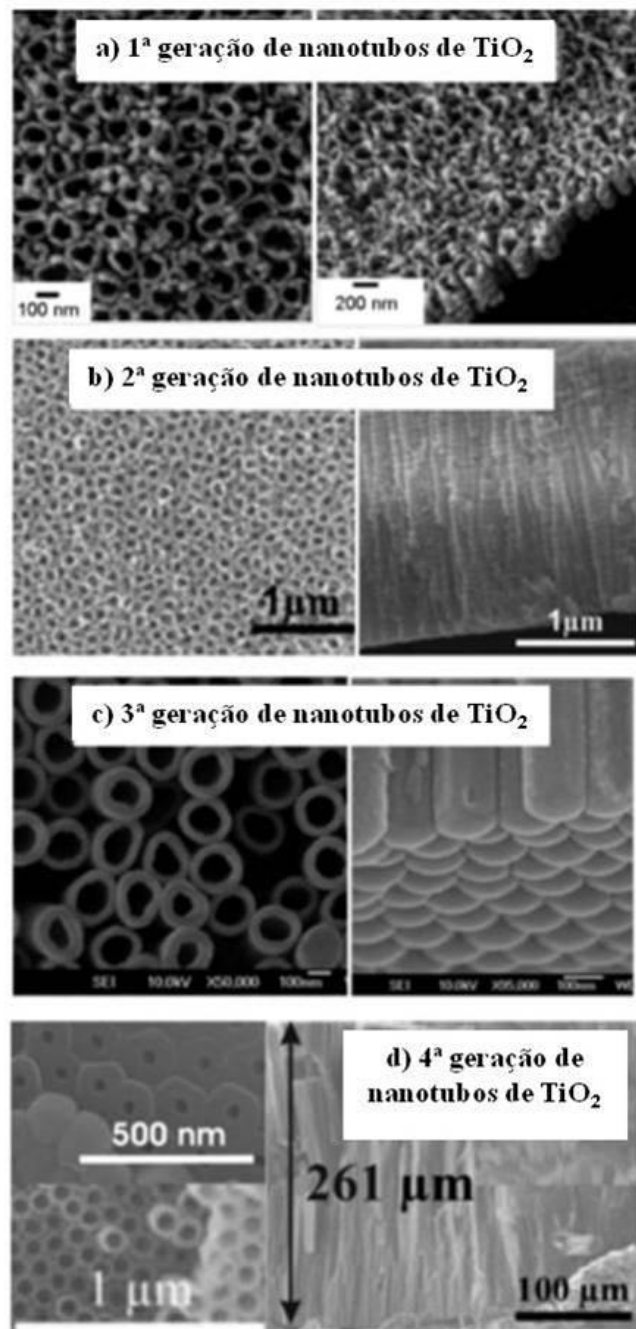


Fonte: adaptado de Regonini et al. (2013)

Recentemente, anodizações com soluções livres de íons de fluoreto vêm sendo estudadas. Como substitutos são usados íons de cloreto, brometo e perclorato. Estes eletrólitos levam a formação de regiões com nanotubos não-ordenados, porém o processo é

mais rápido quando comparado com soluções contendo F^- , produzindo nanotubos longos em poucos minutos. Como não há íons de fluoreto o mecanismo de crescimento das estruturas é diferente. Por ser um processo muito rápido, normalmente, o filme se destaca do substrato, sendo uma técnica barata para a produção de pó de TiO_2 (REGONINI et al., 2013; LECLERE et al., 2008).

Figura 16 - Nanotubos de TiO_2 formados com eletrólitos da (a) primeira, (b) segunda, (c) terceira e (d) quarta geração.



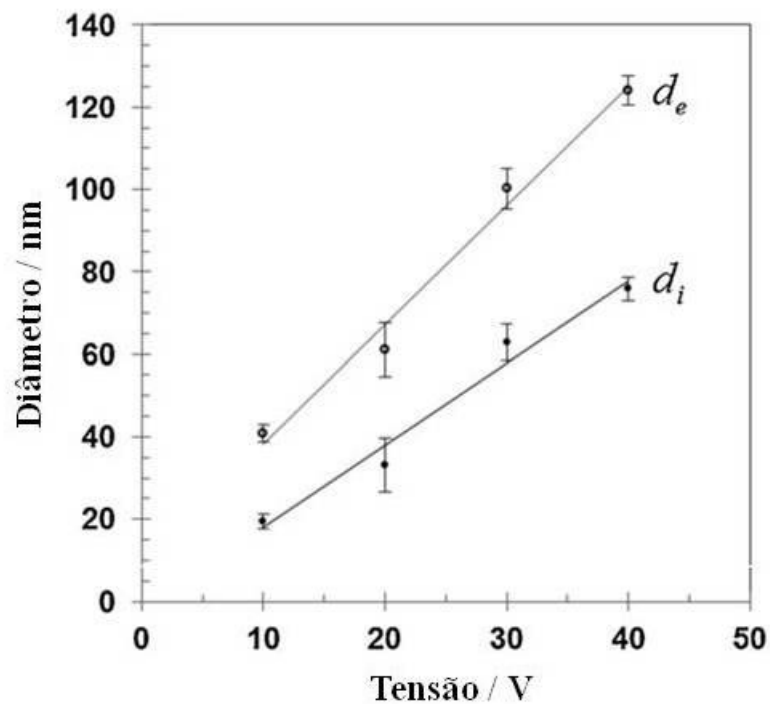
Fonte: adaptado de Regonini et al. (2013).

2.4.3 Potencial de anodização

A tensão elétrica, normalmente, se encontra dentro da faixa de 5 a 60 V, sendo que em eletrólitos aquosos, por serem mais agressivos, são utilizados valores entre 5 e 30 V (MACAK et al., 2007; REGONINI et al., 2013).

A diferença de potencial influencia na migração de íons e na dissociação das moléculas de água, fatores essenciais para o desenvolvimento da camada de óxido. Também existe uma relação entre a tensão aplicada e os diâmetros internos e externos e espessura da parede das nanoestruturas. Segundo Regonini et al. (2012), Valota et al. (2010) e Yoriya et al. (2011), essa relação é diretamente proporcional até 60 V (Figura 17). Outros estudos identificaram uma relação inversa em tensões maiores, como citado por Regonini et al. (2013).

Figura 17 - Relação entre tensão e diâmetro (interno e externo) dos nanotubos de TiO_2 .



Fonte: Adaptado de Regonini et al. (2012)

2.4.4 Tempo de anodização

O tempo é extremamente dependente dos outros parâmetros. Em eletrólitos mais agressivos, como soluções aquosas, o tempo, normalmente, atinge uma faixa de alguns minutos até poucas horas, porém no uso de meios orgânicos pode se chegar a tratamentos que duram até 24 horas. Porém é possível utilizar tempos menores mesmo em condições mais

brandas, diminuindo o pH e aumentando a tensão aplicada, por exemplo (REGONINI et al., 2013).

Por ser menos agressivo em relação ao TiO_2 , a anodização em eletrólito orgânico pode gerar uma camada de óxido sobre o topo dos nanotubos, por exemplo. Para tempos de anodização muito longos, essa camada pode dificultar a troca de íons em determinados pontos da superfície, resultando em um desenvolvimento não homogêneo do filme (REGONINI et al., 2013; REGONINI et al., 2012).

2.4.5 Temperatura

A temperatura do eletrólito influencia a taxa de dissolução, em temperaturas maiores há uma maior mobilidade das moléculas e íons, diminuindo a viscosidade e facilitando a troca de íons no substrato (WANG e LIN, 2009).

Estudos relacionados à variação de temperatura observaram que existe uma influência da temperatura no diâmetro das nanoestruturas, em eletrólitos orgânicos, quanto maior a temperatura de anodização maior o diâmetro. Em soluções aquosas, não foi observado qualquer influência desse tipo (REGONINI et al., 2013).

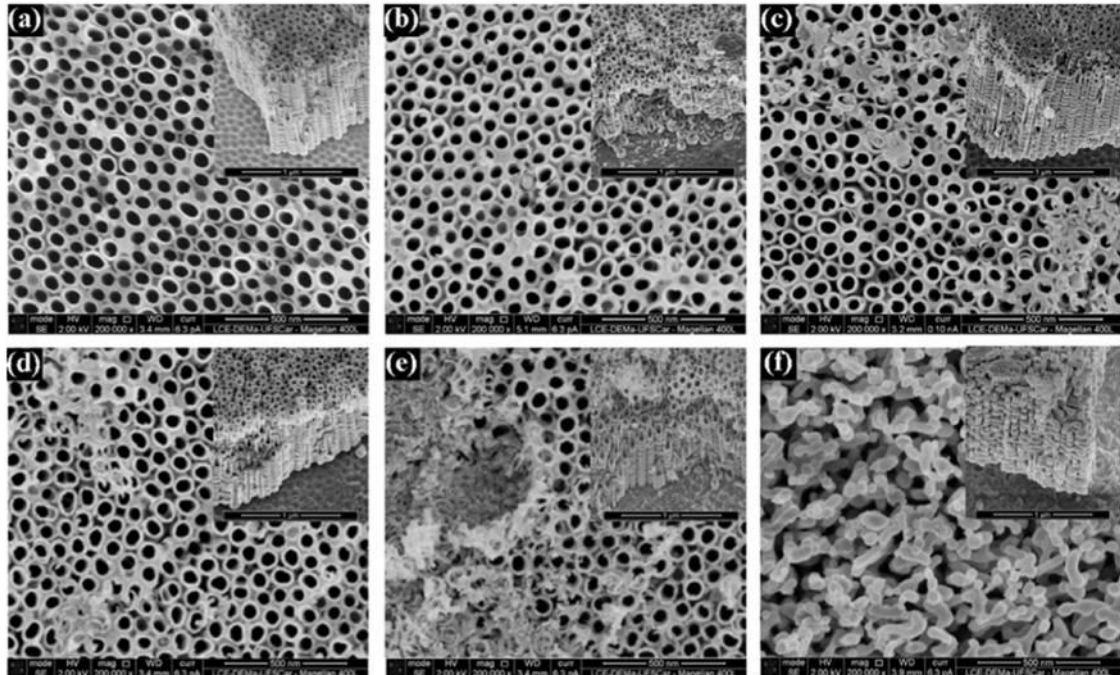
Normalmente a anodização é realizada a temperatura ambiente, que é mais favorável ao crescimento dos nanotubos, pois estudos indicaram que para eletrólitos aquosos, soluções abaixo de 2°C inibiam o crescimento destas estruturas, e que em eletrólitos orgânicos o crescimento não é favorável acima de 40°C (PRIDA et al., 2007; REGONINI et al., 2013).

2.4.6 Estudos avaliando o crescimento de nanoestruturas de TiO_2 por anodização

Estudos de modificação de superfície por oxidação anódica em ligas de Ti têm se tornado mais frequentes, devido às excelentes propriedades de volume, principalmente, em ligas dos tipos $\alpha+\beta$ e β . Rangel et al. (2013) obteve o crescimento de nanotubos de TiO_2 na liga Ti_{15}Mo , após anodização em eletrólito composto por glicerol/ H_2O (9:1, em volume) e 0,25 %, em massa, de NH_4F , sob tensão de 20 e 30 V durante 24 ou 48 h. O mesmo resultado foi obtido na liga $\text{Ti}_{7,5}\text{Mo}$, sob as mesmas condições (20 V e 24 h). Neste estudo, foi analisada a estabilidade térmica e a molhabilidade da camada formada. Houve uma transformação da fase amorfa para a fase anatase entre 400 e 450°C . Em temperaturas superiores a 500°C ocorreu coalescimento dos nanotubos de TiO_2 , devido ao crescimento dos cristais de anatase e formação da fase rutilo (Figura 18). Quando analisada a molhabilidade, a

fase anatase apresentou maior hidrofiliabilidade comparado ao óxido amorfo e ao rutilo (CHAVES et al., 2016).

Figura 18 - Nanotubos de TiO_2 após calcinação a (a) 200 °C, (b) 400 °C, (c) 450 °C, (d) 500 °C, (e) 600 °C e (f) 800 °C.



Fonte: Chaves et al. (2016)

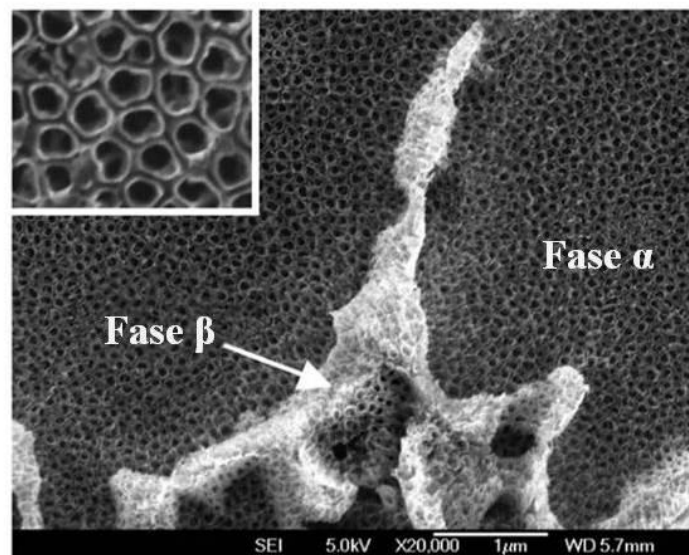
Jin et al. (2016) avaliou a oxidação anódica nas ligas Ti_xNb ($x = 5, 10, 20, 30$ e 40% , em massa). As amostras passaram por um pré-tratamento, no qual foram imersas por 1 s em uma solução composta por $\text{HF}:\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}$ (1:4:2, em vol.), seguido por anodização em etilenoglicol, H_2O (2%, em vol.) e 0,068 M de NH_4F , durante 30 min. Após a remoção, por banho ultrassônico, da camada formada durante o primeiro tratamento, as amostras foram, novamente, anodizadas. Nanotubos de TiO_2 com diâmetro entre 40 e 50 nm e comprimento entre 10 e 20 μm foram obtidos ao final do processo. Os autores não constatarem influência da concentração de nióbio no crescimento dos nanotubos.

Feng et al (2008) obtiveram nanotubos altamente ordenados na superfície da liga $\text{Ti}_{28}\text{Zr}_{18}\text{Nb}$ com a utilização de eletrólito ácido (1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,25 M de NH_4F). Tensões entre 10 e 40 V foram avaliadas e, apesar do crescimento ter ocorrido em todas as condições, a combinação entre tensões maiores e tempos menores foram mais eficientes. Mohan et al (2015), também, fez uso de eletrólito aquoso (0,08 M de HF e 1 M de H_2SO_4) para crescimento de nanotubos na liga $\text{Ti}_{60}\text{Al}_{17}\text{Nb}$.

Resultados favoráveis a formação de estruturas tubulares na liga Ti4Zr22Nb2Sn foram obtidos por Liang et al. (2011), com a utilização de eletrólito orgânico composto por glicerol/H₂O (1:1) e 0,3 M de NaF. Anodização em soluções orgânicas das ligas Ti6Al4Nb (RAFIEERAD et al., 2015), Ti6Al7Nb (MAZARE et al., 2014), Ti36Nb6Ta (FOJT et al., 2013), Ti30Nb3Ta, Ti30Nb15Ta (KIM et al., 2013) e Ti21Nb11Sn (FORNELL et al., 2013) resultaram em crescimento de nanotubos de TiO₂.

O tamanho do grão e as fases da liga influenciaram a morfologia dos nanotubos (REGONINI et al., 2013). Os tubos apresentaram diminuição do diâmetro e aumento do comprimento, quando a liga Ti30NbxTa (x = 0, 3 e 15 %, em massa) apresentava grãos maiores (KIM, 2013). Ferreira et al. (2013) relatou interferência do tamanho dos grãos na formação dos nanotubos no TiCP, Ti6AL e Ti6Al7Nb. Estudos realizados com a liga Ti6Al7Nb, do tipo $\alpha+\beta$, evidenciaram maior dificuldade do crescimento de nanotubos de TiO₂ sobre a fase β (Figura 19). Nesta fase, a formação dos nanotubos foi mais irregular, com diâmetros menores e espessura da parede maior em relação às estruturas formadas sobre a fase α (NGUYEN et al., 2013; MAZARE et al, 2014; FERREIRA et al. 2013).

Figura 19 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da liga Ti6Al7Nb após anodização.



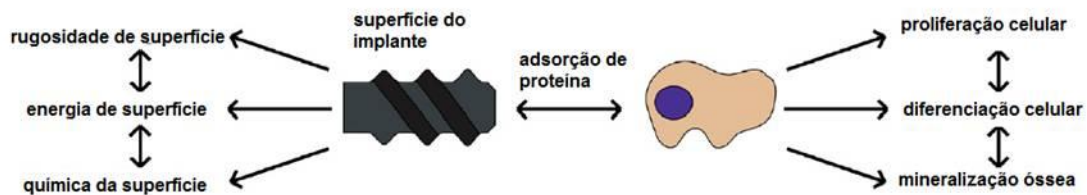
Fonte: adaptado de Ferreira et al. (2013)

2.4.7 Estudos *in vitro* em ligas de titânio após oxidação anódica

A oxidação da anódica leva a mudanças na superfície do material, como por exemplo, topografia e química da superfície, o que pode induzir diferentes respostas após a inserção do material no meio biológico.

De acordo com Minagar et al. (2013), a química da superfície associada a fatores como energia de superfície, ângulo de contato e molhabilidade (hidrofilicidade ou hidrofobicidade), os quais terão uma função importante na resposta da célula. O processo de osseointegração envolve uma série de eventos complexos em cadeia que tem início na adsorção de proteínas, com subsequente adesão celular, proliferação dos osteoblastos (Figura 20) sendo favorecido pelo aumento da energia de superfície e diminuição do ângulo de contato (GITTENS et al., 2014).

Figura 20 - Representação da relação entre as propriedades de superfície e a resposta biológica.



Fonte: Minagar et al. (2012)

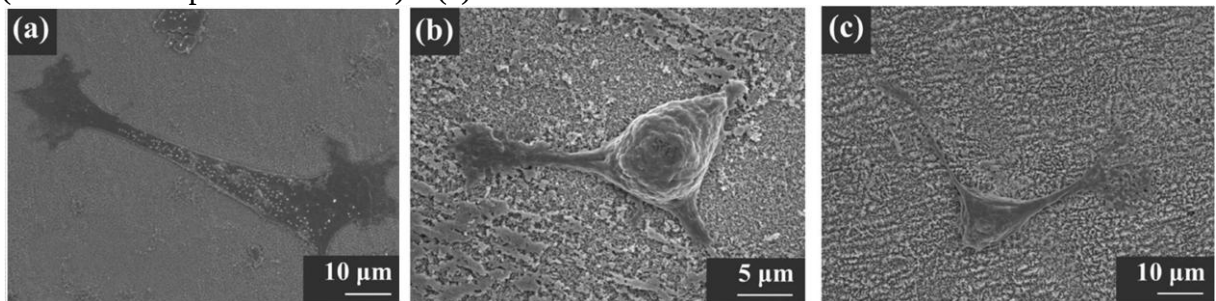
OH et al. (2009) estudou a adesão e diferenciação de células-tronco, denominadas células mesenquimais (MSC), sobre nanotubos de TiO_2 com diâmetros entre 30 e 100 nm. Estas células são capazes de se diferenciarem em vários outros tipos, entre eles: fibroblastos e osteoblastos. Neste trabalho constatou-se que quanto menor o diâmetro da nanoestrutura, melhor é a adesão celular, isto ocorre devido à maior presença de proteínas, devido a um maior caráter hidrofílico da superfície. Para diâmetros maiores há um maior alongamento e espalhamento das células em busca de proteínas, que trás como consequência, uma maior diferenciação das células, especialmente em osteoblastos. Desta forma, a topografia apresenta grande influência no processo de osseointegração, onde se deve procurar um ponto ótimo com boa adesão e diferenciação celular.

Outros estudos com o objetivo de crescimento de nanotubos de TiO_2 no titânio e suas ligas, têm apresentado resultados promissores. Capellato et al. (2012) relatou excelente adesão celular na liga Ti30Ta após crescimento de nanotubos de TiO_2 . Análises *in vitro* realizadas por Neacsu et al. (2015) com ligas do sistema Ti-Mo-Nb, que apresentam excelentes

propriedades de volume (XU et al., 2008; ALMEIDA et al, 2014; CHELARIU et al, 2014), demonstraram boa adesão e crescimento celular, com respostas inflamatórias insignificantes, evidenciando excelente comportamento para o uso em aplicações biomédicas.

Jin et al. (2016), compararam diferentes arquiteturas da camada de TiO_2 formada por oxidação anódica. Neste trabalho, foi analisada uma estrutura porosa, uma tubular e outra intermediária. A camada porosa se destacou em relação às demais tanto na adesão do óxido a superfície da liga, como na resposta biológica com melhor adesão e espalhamento das células (figura 21).

Figura 21 — MEV de células MC3T3 – E1 em camada de TiO_2 (a) porosa, (b) intermediária (entre camada porosa e tubular) e (c) nanotubular.



Fonte: adaptado de Jin et al. (2016).

A inserção de um biomaterial dentro do corpo humano também pode ser susceptível à colonização microbiana uma vez que os mecanismos de defesa são muito fracos na presença de um material estranho, e ao menos que possua propriedade bactericida, a superfície do implante não irá barrar o crescimento das bactérias. Isso pode gerar infecções (BAI – Biomaterial Associated Infections) que por sua vez levarão à falha do implante (ATEFYEKTA et al. 2016)

As bactérias poderão ser originadas da pele e/ou mucosa do próprio paciente durante o procedimento cirúrgico aderindo à superfície do implante com a formação de biofilmes. *Staphylococcus epidermidis* é o organismo frequentemente isolado dos biofilmes sendo associado à infecções em próteses de válvulas cardíacas, cateteres venosos e urinários e dispositivos intrauterinos (COLON et al., 2006)

Em relação à adesão bacteriana o TiO_2 apresenta vantagens, pois seu efeito catalítico já atua como um agente bactericida, ainda que fraco. Além disso, é possível utilizar elementos de liga com essa mesma ação, por exemplo, o molibdênio (ZHANG; WANG; LEVÄNEN, 2013).

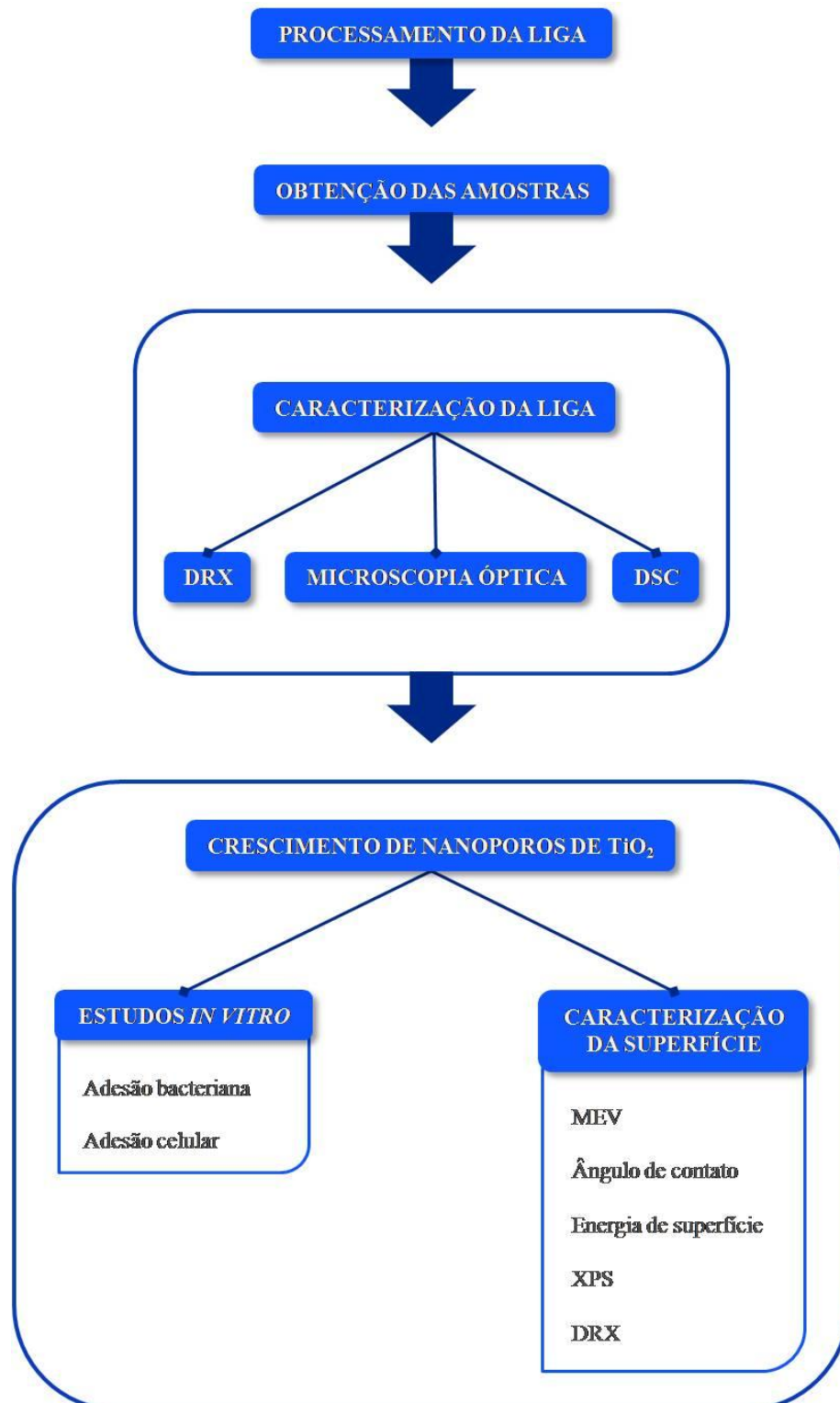
Puckett et al. (2010) avaliaram a adesão de biofilmes formados por *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *S.aureus* em superfícies nanotubulares e nanotexturizadas, obtidas por oxidação anódica, nanorugosas, criadas por electron beam, e lisas. Os autores verificaram que a presença de flúor nas superfícies nanotexturizadas e nanotubulares, resultante do processo de oxidação anódica, levou a maior adesão bacteriana, sendo a menor adesão verificada nas superfícies nanorugosas e convencionais, nessa sequência, para os 3 tipos de organismos avaliados.

A influência da área superficial específica na adesão bacteriana foi avaliada por Li et al. (2013). A partir da análise de superfícies contendo nanotubos com diâmetros variando de 50 a 200 nm os autores verificaram menor adesão para as superfícies contendo nanotubos de diâmetro de 200 nm, ou seja, com mais área superficial específica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A figura 22 apresenta o fluxograma com as principais etapas empregadas no desenvolvimento dessa pesquisa.

Figura 22 – Fluxograma da metodologia aplicada nesse trabalho.

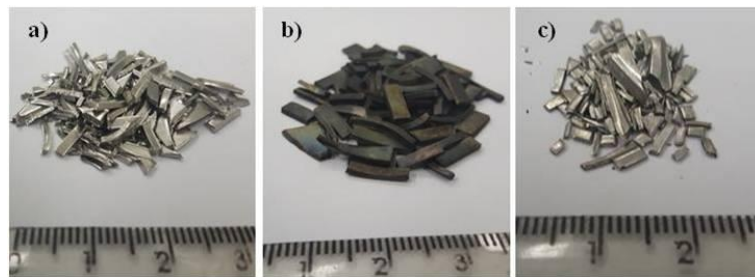


Fonte: Autor

3.1 PROCESSAMENTO DA LIGA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os lingotes da liga Ti10Mo8Nb foram obtidos a partir da fusão de metais comercialmente puros: titânio (grau 2), molibdênio e nióbio. As chapas destes metais foram cortadas, com o auxílio de uma guilhotina, em pequenos pedaços (Figura 23), os quais foram limpos quimicamente por imersão em uma solução composta por HF (48%) e HNO₃, na proporção 1:3, durante de 15 segundos. Após a limpeza química, os metais foram enxaguados e secos.

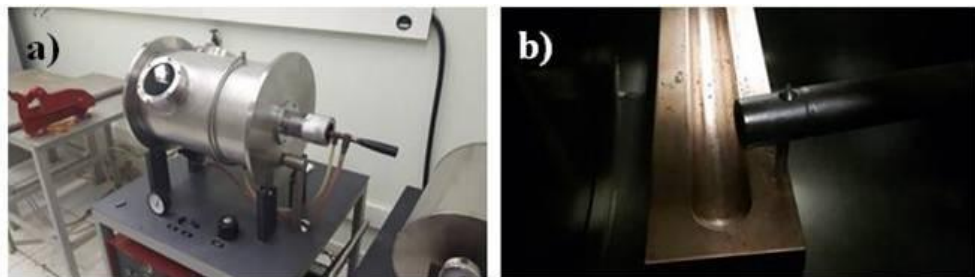
Figura 23– Metais utilizados para preparo da liga, após corte: (a) titânio, (b) molibdênio e (c) nióbio.



Fonte: Autor

Para obtenção da liga foi utilizado um forno a arco voltaico (Figura 24) com cadinho de cobre refrigerado a água e atmosfera inerte (gás argônio). Para evitar a oxidação da liga foi realizado o processo de purga, por pelo menos cinco vezes. Anteriormente a fusão, os metais foram pesados, em balança analítica, conforme a proporção: 82% Ti, 10% Mo e 8% Nb. A fusão de cada lingote ocorreu em quatro etapas. Durante as três primeiras foram obtidos três botões de 25 g, na quarta etapa, os três botões foram unidos formando o lingote. Para garantir que não houvesse inclusões, cada botão foi refundido pelo menos 10 vezes.

Figura 24 – (a) Forno a arco voltaico. (b) Interior do forno, detalhando o cadinho de cobre e eletrodo de tungstênio.



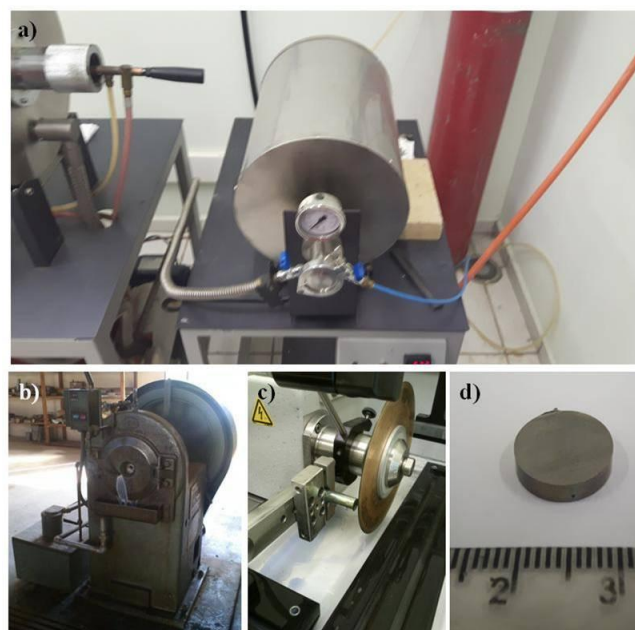
Fonte: Autor

Após a fusão, os lingotes foram tratados termicamente em um forno tubular com atmosfera inerte (Figura 25 (a)). O primeiro tratamento realizado foi à homogeneização, com o objetivo de garantir a mesma composição em toda a extensão do lingote. A amostra foi inserida no forno em um cadinho de alumina e, em seguida, por meio do processo de purga, com gás argônio, foi realizado o vácuo no interior do tubo. O forno foi aquecido até 1000 °C, com uma taxa de aquecimento de 16,5 °C/min. A amostra foi mantida nessa temperatura durante 1440 min (24 h) e o resfriamento ocorreu lentamente, dentro do forno. O segundo tratamento utilizado foi à solubilização, para estabilizar fase beta. O lingote foi aquecido até 950 °C (16,5 °C/min) sob vácuo e mantido nesta temperatura por 60 min, seguido de resfriamento rápido, em água com gelo.

Após os tratamentos térmicos, o lingote foi forjado a frio em prensa rotativa (DEMAR – USP) (Figura 25 (b)), com o objetivo de se obter um formato regular com diâmetro de aproximadamente 10 mm. Em seguida, a barra foi limpa, com água, sabão neutro e acetona e, novamente, realizado o tratamento térmico de solubilização, para garantir a presença da fase β .

As barras de Ti10Mo8Nb foram cortadas em discos com espessura de 3 mm (Figura 26 (d)), utilizando o equipamento ISOMET 4000 da Buehler (Figura 26 (c)), com disco de corte diamantado.

Figura 25— (a) Forno com tubo de quartzo utilizado nos tratamentos térmicos e equipamentos utilizados durante o (b) forjamento do lingote e (c) corte (d) das amostras.



Fonte: Autor

3.2 OXIDAÇÃO ANÓDICA

A liga experimental Ti10Mo8Nb, foi testada em diversas condições de preparo de superfície, com diferentes eletrólitos, potenciais e tempos de tratamento, até se definir a melhor superfície.

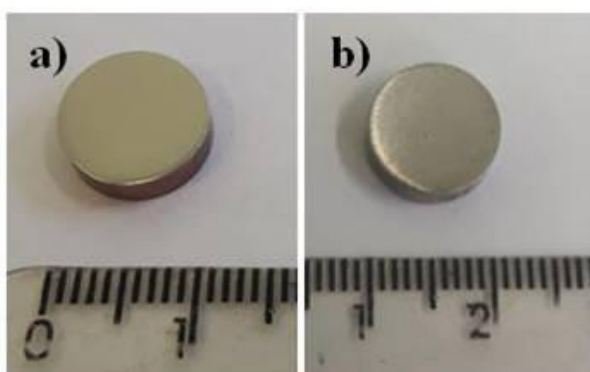
Três pré-tratamentos foram utilizados: lixadas até granulometria 1200, polidas com sílica coloidal e amostras que foram atacadas com solução ácida (Quadro 2).

Quadro 2 - Condições de pré-tratamento da superfície.

Superfície	Preparo
Lixada	As amostras foram lixadas na bancada de lixamento, sob fluxo de água, com lixas de granulometrias: 100, 220, 400, 600 e 1200. Em seguida, as amostras foram lavadas em banho ultrassônico durante 20 minutos, imersas em água deionizada e sabão neutro, depois, por 20 minutos em água deionizada e, por fim, durante 5 minutos com álcool isopropílico. Em seguida, elas foram secas naturalmente, expostas ao ar (Figura 26(a)).
Polida	As amostras foram lixadas até a granulometria 1200 e lavadas durante 10 minutos em banho ultrassônico com água deionizada. Depois, elas foram polidas com sílica coloidal em suspensão, lavadas e secas (Figura 26(b)).
Atacada	As amostras foram lixadas até granulometria 1200 e limpas. Posteriormente, as amostras foram imersas em uma solução composta por HNO_3 : HF : H_2O (12:7:81, em % vol., respectivamente) durante 20 segundos, a temperatura ambiente. Em seguida, foram enxaguadas com água deionizada e secas em estufa, a aproximadamente 40 °C. Este procedimento foi uma adaptação do estudo de Nguyen e colaboradores (2013)

Fonte: Autor.

Figura 26– Amostras de Ti10Mo8Nb após (a) lixamento e (b) polimento.



Fonte: Autor

Para a modificação da superfície foram testados diversos eletrólitos compostos a partir de: glicerol (99,5%), H_2O e NH_4F em diversas concentrações; H_3PO_4 , NH_4F e H_2O ; e H_3PO_4 , NaF e H_2O . A composição de cada eletrólito é apresentada no quadro 3.

Quadro 3 – Composição dos eletrólitos testados.

Composição do Eletrólito	
Eletrólito Orgânico (para cada 100 mL de solução)	
Solução 1	90 mL de Glicerol + 10 mL de H ₂ O + 0,25 g de NH ₄ F
Solução 2	50 mL de Glicerol + 50 mL de H ₂ O + 0,27 g de NH ₄ F
Solução 3	50 mL de Glicerol + 50 mL de H ₂ O + 1,00 g de NH ₄ F
Solução 4	75 mL de Glicerol + 25 mL de H ₂ O + 1,25 g de NH ₄ F
Eletrólito Aquoso	
Solução 5	1,0 Mol/L H ₃ PO ₄ + 0,2 Mol/L NH ₄ F
Solução 6	1,0 Mol/L H ₃ PO ₄ + 0,2 Mol/L NaF

Fonte: Autor.

Dois potenciais diferentes foram utilizadas: 20 e 30 V. Para tempos acima de 1 h foi aplicada uma taxa de crescimento da tensão de 16 mV/s. Para tratamentos com duração de 1h foram utilizadas duas taxas: 16 mV/s e 200 mV/s. Após atingir a tensão desejada o processo foi mantido por períodos entre 1 e 24 h, conforme apresentado nos quadros de 4 a 9.

A célula utilizada era composta por dois eletrodos, um de trabalho (ânodo) e um contra-eletrodo de platina, ligados a uma fonte de tensão e um recipiente para conter o eletrólito (Figura 27).

Figura 27 – (a) Material utilizado durante o processo de oxidação anódica: eletrodo de platina e porta amostra. (b) Célula durante anodização.



Fonte: Autor

As amostras foram colocadas na célula por meio do porta-amostra (Figura 27 (a)). Após atingir a tensão desejada, as amostras ficaram em tratamento durante o tempo estabelecido e, em seguida, foram limpas em água deionizada por enxágue ou por banho ultrassônico, neste caso foram utilizados tempos de 5 min e 5s.

Por fim, as amostras foram calcinadas em um forno do tipo mufla por 60 minutos, sob uma temperatura de 450 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min. O resfriamento

ocorreu lentamente dentro do forno. Após o tratamento as amostras foram mantidas no dessecador, sob pressão de -400 mmHg até o momento das análises.

Os quadros de 4 a 9 apresentam todas as condições testadas para modificação na liga Ti10Mo8Nb para o crescimento de nanotubos de TiO_2 .

Quadro 4 – Condições de oxidação anódica com a solução 1.

Eletrólito	Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza
Solução 1	20V	24 h	Polida	Ultrassom – 5 min
Solução 1	30V	24 h	Polida	Ultrassom – 5 min

Fonte: Autor

Quadro 5 – Condições de oxidação anódica com a solução 2.

Eletrólito	Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza
Solução 2	20 V	2 h	Lixada - #1200	Ultrassom – 5 min
Solução 2	20 V	3 h	Lixada - #1200	Ultrassom – 5 s
Solução 2	20 V	3 h	Polida	Ultrassom – 5 min
Solução 2	20 V	6 h	Polida	Ultrassom – 5 min
Solução 2	20 V	12 h	Polida	Ultrassom – 5 min
Solução 2	20 V	24 h	Polida	Ultrassom – 5 min

Fonte: Autor

Quadro 6 – Condições de oxidação anódica com a solução 3.

Eletrólito	Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza
Solução 3	20 V	1 h	Lixada - #1200	Ultrassom – 5 min
Solução 3	20 V	1 h	Lixada - #1200	Enxágue
Solução 3	20 V	1 h	Lixada - #1200	Ultrassom – 5 s
Solução 3	20 V	1 h	Ataque ácido	Ultrassom – 5 s

Fonte: Autor

Quadro 7 – Condições de oxidação anódica com a solução 4.

Eletrólito	Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza
Solução 4	20 V	1 h	Ataque ácido	Ultrassom – 5 s
Solução 4	20 V	1 h	Ataque ácido	Enxágue
Solução 4	20 V	1 h	Lixada - #1200	Ultrassom – 5 s
Solução 4	20 V	1 h	Lixada - #1200	Enxágue
Solução 4	20 V	2 h	Ataque ácido	Ultrassom – 5 s
Solução 4	20 V	3 h	Ataque ácido	Ultrassom – 5 s
Solução 4	20 V	4 h	Ataque ácido	Ultrassom – 5 s
Solução 4	30 V	4 h	Ataque ácido	Ultrassom – 5 s

Fonte: Autor

Quadro 8 – Condições de oxidação anódica com a solução 5.

Eletrólito	Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza
Solução 5	20 V	1 h	Lixada - #1200	Ultrassom – 5 s

Fonte: Autor.

Quadro 9 – Condições de oxidação anódica com a solução 6.

Eletrólito	Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza
Solução 6	20 V	1 h	Lixada - #1200	Ultrassom – 5 s

Fonte: Autor

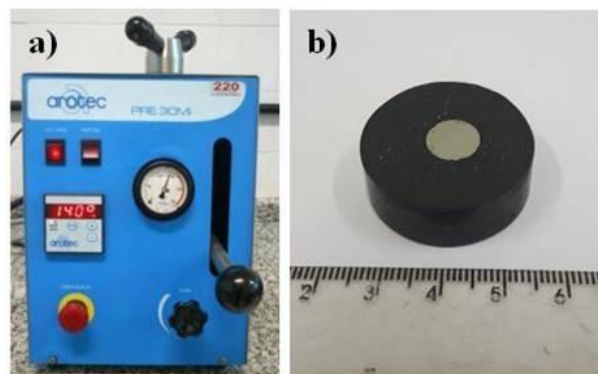
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA LIGA

3.3.1 Microscopia óptica

As amostras seccionadas da barra de Ti10Mo8Nb foram embutidas em baquelite utilizando a embutidora da Arotec (Figura 28), sendo aquecidas a 140 °C com pressão mantida entre 100 e 150 Kgf/cm². Após o embutimento, as amostras foram lixadas manualmente até lixa de granulometria 1200, seguido de banho em ultrassom com água durante 10 minutos. O polimento foi realizado com sílica coloidal e as amostras foram limpas em banho ultrassônico durante 20 minutos, imersas em água deionizada e sabão neutro, depois, por 20 minutos em água deionizada e, por fim, durante 5 minutos com álcool isopropílico

Após o ataque da superfície com solução composta por HF, HNO₃ e H₂O (5:10:85, % em vol.), as amostras foram analisadas com o microscópio de luz refletida Epiphot (Nikon), no Departamento de Materiais e Tecnologia da UNESP, campus de Guaratinguetá.

Figura 28 – (a) Equipamento utilizada para embutir e (b) amostra após embutimento.



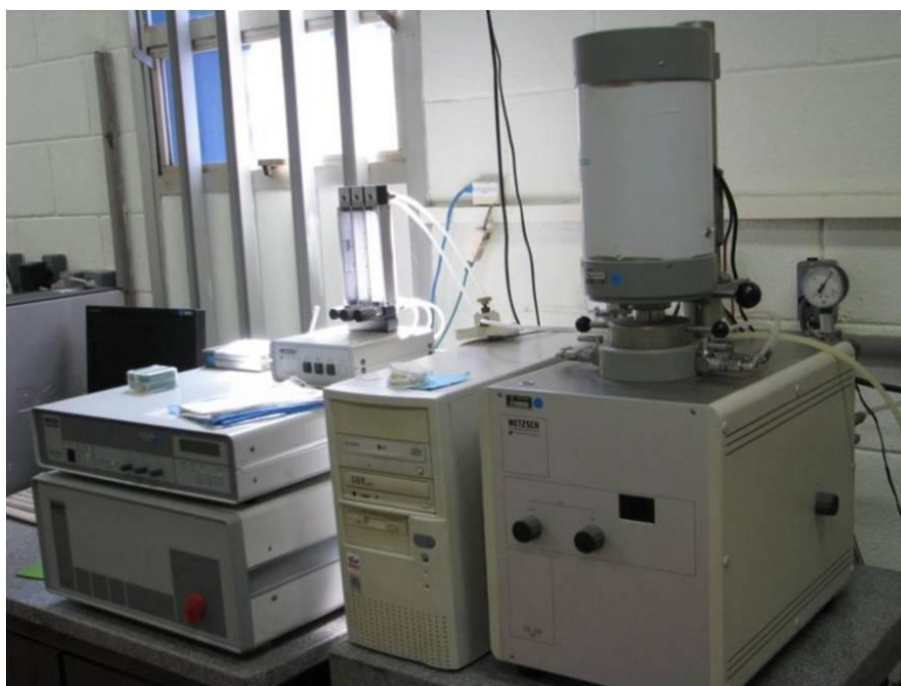
Fonte: Autor

3.3.2 Calorimetria exploratória diferencial

A análise foi realizada no Departamento de Manufatura e Materiais, Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, em um equipamento da marca NETZSCH, modelo STA 409 C/CD (Figura 29).

Para a análise foram utilizados cadinhos de Al_2O_3 e uma amostra de 34 mg da liga Ti10Mo8Nb. Dois ciclos de aquecimento ($10\text{ }^\circ\text{C/min}$) foram realizados: a amostra foi aquecida até $1000\text{ }^\circ\text{C}$ e resfriada até $100\text{ }^\circ\text{C}$, novamente, aquecida até 1000°C e resfriada. Durante a análise foi mantido um fluxo de 100 mL/min de gás argônio no interior da câmara.

Figura 29 – Equipamento de calorimetria exploratória diferencial.



Fonte: Konatu, 2014

3.3.3 Difração de raios X

A análise da microestrutura presente na liga foi realizada por meio da difração de raios X. As medidas foram realizadas no Instituto de Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, em São José dos Campos – SP, com um equipamento Panalytical X'Pert e detector X'Celerator, utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$, com corrente de 40 mA , tensão de 45 kV , intervalo 2θ de medição de 5° a 90° , com passo de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 5 s .

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

3.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar a morfologia da superfície da amostra após o tratamento de oxidação anódica foi utilizada a microscopia eletrônica. Os microscópios utilizados foram: FEI Magellan 400 L e Phillips XL-30 FEG do Laboratório de Caracterização Estrutural do DeMA da UFSCar, MEV - JOEL do INPE, MEV do Departamento de Materiais e Manufatura da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP, e o MEV- EVO, marca ZEISS, do Departamento de Materiais e Tecnologia da UNESP-FEG.

3.4.2 Espectroscopia Raman

As medidas de espectroscopia Raman foram realizadas no Instituto de Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, em São José dos Campos – SP, sob temperatura ambiente, em um espectrômetro da marca Horiba Scientific T64000 utilizando como fonte de excitação um laser de Argônio com comprimento de onda de 514 nm. Foram analisadas amostras da liga Ti10Mo8Nb antes e após oxidação anódica, e após calcinação em diferentes temperaturas.

3.4.3 Difração de raios X

A análise da estrutura presente na liga foi realizada por meio da difração de raios X. As medidas foram realizadas no Instituto de Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, em São José dos Campos – SP, com um equipamento Panalytical X'Pert e detector X'Celerator, utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$, com corrente de 40 mA, tensão de 45 kV, intervalo 2θ de medição de 5° a 90° , com passo de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 5 s.

3.4.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

Para análise dos óxidos presentes na superfície da liga Ti10Mo8Nb antes e após tratamento foi utilizada espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X, utilizando o espectrômetro PHI-5800 (Physical Electronics), pertencente a *Colorado State University* - CSU, utilizando uma fonte de raios X monocromática Al $\text{K}\alpha$, sob uma tensão de 15 kV com recepção dos fotoelétrons a um ângulo de 45° em relação a amostra.

3.4.5 Ângulo de contato

Para medição do ângulo de contato das superfícies analisadas foi utilizado um equipamento da marca Krüss, modelo DSA 100S do Departamento de Materiais e Tecnologia da UNESP-FEG. O método empregado foi o da gota sésil. As medidas foram feitas a temperatura ambiente com gotas de 2 μ L de água deionizada. Foram analisadas as superfícies da liga Ti10Mo8Nb após lixamento, anodização sem calcinação e anodização seguida de calcinação a 450 °C.

3.4.6 Energia de superfície

A medição da energia de superfície total foi realizada com um goniômetro RamèHart 300 – f1, pertencente ao Departamento de Física e Química da UNESP-FEG, por meio do método goniômetro. Para as medidas de energia polar foi utilizada água deionizada, enquanto que para o cálculo da componente dispersiva foi utilizado etilenoglicol. Foram analisadas as superfícies da liga Ti10Mo8Nb após lixamento, anodização sem calcinação e anodização seguida de calcinação a 450 °C.

3.5 ESTUDOS *IN VITRO* – ADESÃO CELULAR E PROLIFERAÇÃO BACTERIANA

Anteriormente as análises *in vitro*, as amostras foram esterilizadas por radiação gama no CNEM - IPEN (SP).

3.5.1 Proliferação bacteriana

Os estudos de adesão bacteriana foram realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.

Os biofilmes foram formados conforme metodologia proposta por Pereira et al. (2011), com modificações. Inicialmente foram preparadas suspensões padronizadas utilizando a cepa padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). A cepa de *S. epidermidis* foi semeada em ágar infusão cérebro-coração- BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco, Detroit, USA). Após, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h. Decorrido o período de incubação, colônias do micro-organismo foram suspensas em salina tampão fosfato – PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Gibco, New York,

USA), e ajustada em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal, São Paulo, Brasil), até obtenção de suspensão padronizada contendo 10^6 células/mL.

Os biofilmes foram formados em discos de 3 mm de espessura e 10 mm de diâmetro da liga Ti10Mo8Nb. Foram analisados dois grupos: grupo 1, formado pela a liga após lixamento ;e grupo 2, com amostras após anodização da superfície por 1 h a 20 V, em solução composta por água deionizada e glicerol (1:1, em vol.) com adição de 2,7 g/L de NH_4F e calcinadas a 450 °C.

Os discos foram colocados em placas de 24 poços (Costar Corning, New York, USA) contendo 2 mL de infusão cérebro coração - BHI (Difco, Detroit, USA) suplementado com 5% de sacarose e inoculado com 0,1 mL da suspensão bacteriana. Os discos foram incubados a 37°C por 48 h. O caldo foi trocado após 24 h de incubação. Após este período, os discos com os biofilmes foram assepticamente lavados com 2 mL de PBS, para remover os micro-organismos fracamente aderidos.

Os discos foram colocados em tubos contendo 10 mL de PBS e sonicado (30 W, Sonics Vibra Cell, Connecticut, USA) por 30 s para dispersar os biofilmes. A suspensão microbiana obtida foi considerada com fator diluição 10^{-1} , e a partir desta foram realizadas novas diluições decimais (10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} e 10^{-8} ,) em PBS (Gibco), das quais alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em placas de ágar BHI (Difco). Após o período de incubação a 37°C por 48 horas, os números de colônias foram contados, calculados em UFC/mL, e transformados em $\log_{10}$.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo teste T de Student, considerando-se diferença estatística quando $p < 0,05$, com o software Minitab 14 (Inc. PA, USA).

3.5.2 Cultura celular

Foram verificadas à viabilidade, adesão e proliferação celular de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) após 1 e 7 dias de cultura. Estas análises foram realizadas na *Colorado State University*, com colaboração o Dr. Ketul Popat.

Para análise da viabilidade, as células aderidas foram incubadas por 4 h a 37 °C em α -MEM fresco e *Alamar Blue Reagent* a 10%, que é um indicador da presença de células viáveis, quando muda a coloração de azul para vermelho. Após esse período mediu-se a densidade óptica da solução a 570 e 600 nm utilizando um espectrofotômetro (FLUO – Star Omega; BMG Labtech).

A adesão e proliferação celular foram analisadas conforme a metodologia: as superfícies foram incubadas por 3min com Triton – X100 a 1%, com a função de permeabilizar as células, depois elas foram lavadas com PBS. Em seguida, as células foram incubadas em corante de Rodamina Paloidini (actina-citoesqueleto) a 70 mM por 30 min a temperatura ambiente, e nos 5 min finais foi adicionado 4'6 – diamidino – 2 – fenilindole DAPI a 300 mM. Após, toda a solução foi aspirada e as superfícies foram lavadas com PBS.

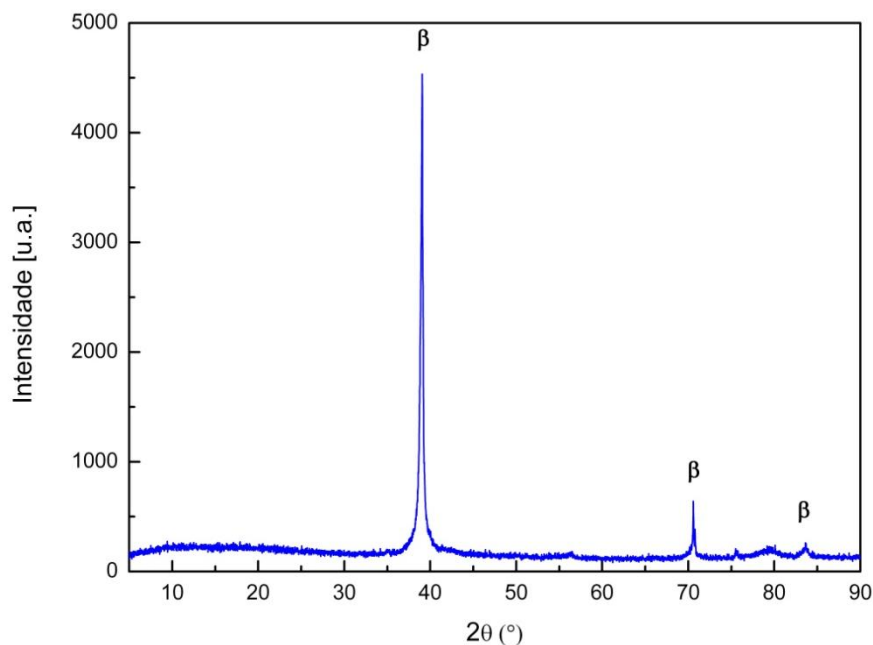
Para análise do número de células aderidas e seu espalhamento foram utilizados um microscópio de fluorescência Zeiss Imager – A2 e o software *ImageJ*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA LIGA

Na Figura 30 é mostrado o difratograma de raios-X obtido para a liga Ti10Mo8Nb submetida ao tratamento térmico de solubilização a 950 °C por 1h. Todos os picos foram indexados como fase β . Sendo que esses resultados estão de acordo com estudos anteriores de Chelariu et al (2014) e Neacsu et al. (2015) para a mesma liga e também de Xu et al (2008) para as ligas Ti10Mo7Nb e Ti10Mo10Nb.

Figura 30 – Difratograma de raios x da liga Ti10Mo8Nb após tratamento térmico de solubilização.

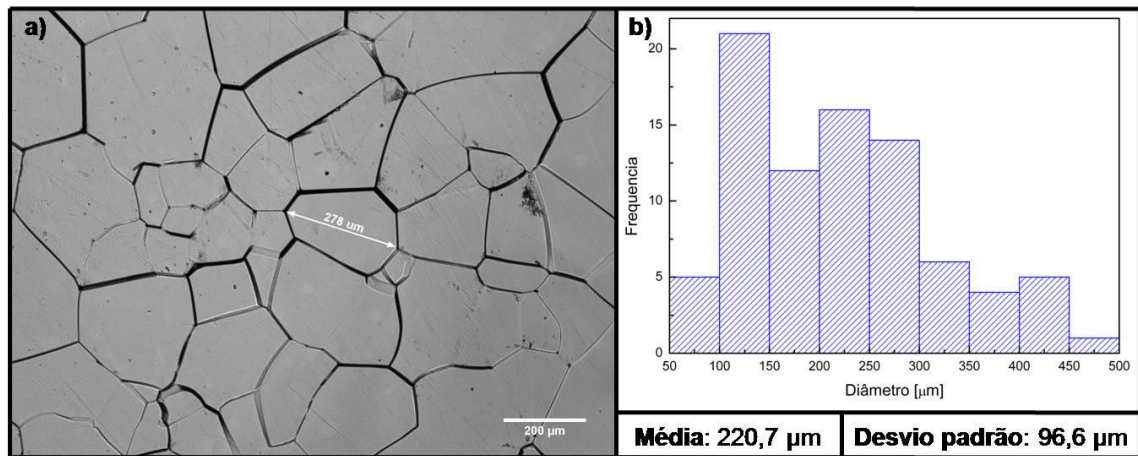


Fonte: Autor

Na figura 31 (a) é possível observar a microestrutura da liga Ti10Mo8Nb após solubilização, característica de ligas de titânio do tipo β . Foi observada a formação de grãos com tamanho médio de 220,7 μm (Figura 31 (b)), com variação de 50 a 500 μm . Esses valores foram superiores aos verificados por Chelariu et al (2014), aonde foram encontrados tamanhos de grão de 10 a 100 μm .

A diferença entre os resultados pode ser explicada a partir do tratamento térmico realizado. Chelariu et al (2014) utilizaram temperatura e tempo menores durante o tratamento de solubilização, 850 °C durante 30 min, resultando em um crescimento de grão inferior ao obtido neste trabalho.

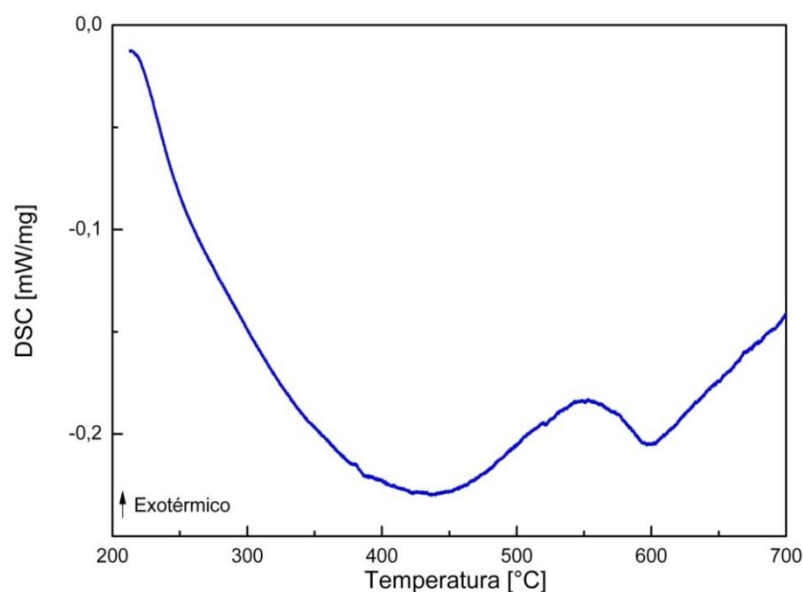
Figura 31 – a) Microscopia da liga Ti10Mo8Nb, b) Histograma e valor médio dos diâmetros dos grãos.



Fonte: Autor

Conforme pode ser observado na curva resultante da análise de DSC (Figura 32) a temperatura de transição para a fase β da liga Ti10Mo8Nb ocorre em torno de 600 $^{\circ}\text{C}$. Desta forma, para se obter a liga com microestrutura cúbica se faz necessário trabalhar com tratamentos térmicos com temperaturas superiores a 600 $^{\circ}\text{C}$ seguido de resfriamento rápido. Outro ponto interessante que se pode extrair da análise térmica é a diminuição de cerca de 280 $^{\circ}\text{C}$ na temperatura β -transus, devido à presença de elementos de liga β -estabilizadores, molibdênio e nióbio.

Figura 32 – Segundo aquecimento da calorimetria exploratória diferencial da liga Ti10Mo8Nb.

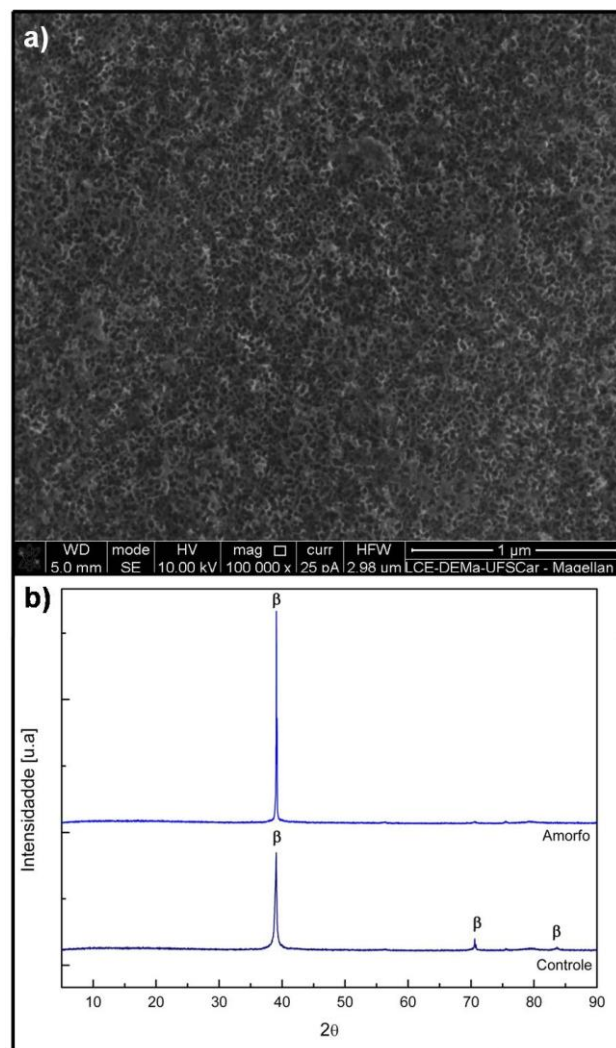


Fonte: Autor

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

Na Figura 33 é possível observar as imagens de topo obtidas em FE – MEV da superfície da liga Ti10Mo8Nb após oxidação anódica em eletrólito formado pela adição de 2,7 g de NH_4F a cada litro da solução glicerol/água (1:1, em volume), sob tensão de 20 V durante 3 horas. Essa condição foi escolhida a partir de estudos preliminares sobre a morfologia da superfície formada após oxidação anódica, variando os parâmetros de tensão, eletrólito e tempo (Apêndice A) O processo de anodização gerou uma camada de óxido porosa, com nanoporos interligados e amorfa como pode ser observado pela ausência de novos picos no difratograma da figura 33 (b).

Figura 33 – (a) Imagem FE-MEV mostrando a superfície de topo da liga Ti10Mo8Nb (b) difratograma de raios X do substrato e da liga Ti10Mo8Nb ambos após oxidação anódica em eletrólito formado pela adição de 2,7 g de NH_4F a cada litro da solução glicerol/água (1:1, em volume), sob tensão de 20 V durante 3 horas.



Fonte: Autor

O comportamento celular pode ser afetado pela cristalinidade de TiO_2 . Bai et al. (2011) verificaram menor número de filopodias nas superfícies contendo a fase rutilo, calcinadas a 600°C comparada a calcinadas a 450°C (anatase). Nesses casos, a formação do rutilo levou a destruição dos nanotubos, o que levou a alteração na topografia. Após a anodização a estrutura do TiO_2 é amorfa. O aquecimento a temperaturas superiores a 450°C pode originar a formação das fases anatase e rutilo para diferentes temperaturas de acordo com a composição da liga (Veríssimo et al. 2014).

No presente estudo, a liga $\text{Ti}_{10}\text{Mo}_8\text{Nb}$ foi submetida a temperaturas de calcinação de 400°C , 450°C , 500°C , 550°C , 600°C , 650°C durante 1 h.

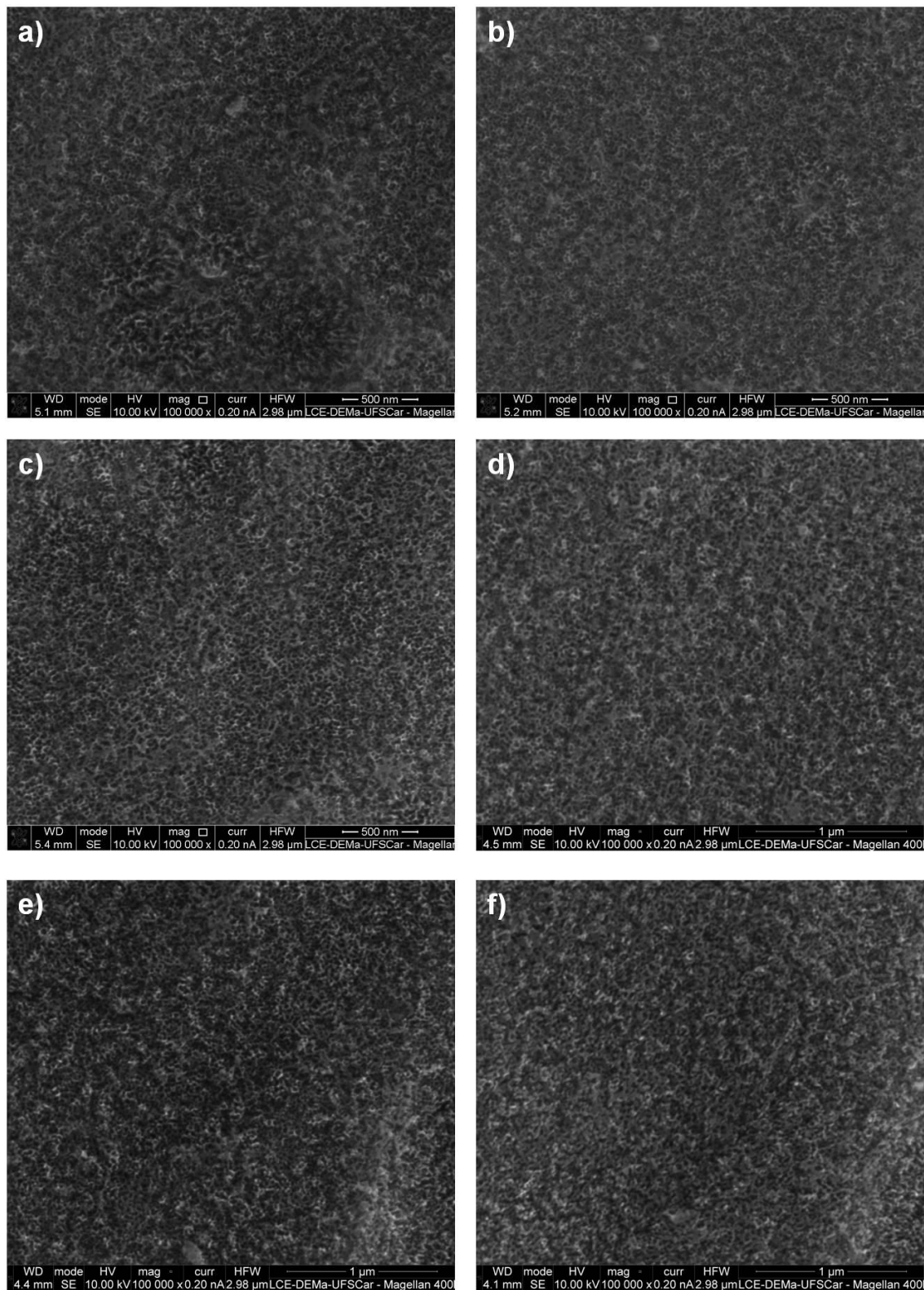
A figura 34 apresenta imagens de topo obtidas em FE – MEV da superfície após anodização e calcinação. É possível observar uma grande semelhança entre as imagens, não sendo constatado colapso dos poros ou diferenças significativas na sua arquitetura com o aumento da temperatura de calcinação.

Nas análises empregando espectroscopia Raman e difração de raios X surgiram diferenças referentes à estrutura da camada de óxido formada. A figura 35 apresenta os espectros Raman da liga $\text{Ti}_{10}\text{Mo}_8\text{Nb}$ após a anodização e calcinação. O surgimento de picos se dá apenas após o tratamento térmico e todos são relacionados a TiO_2 .

Na curva da amostra calcinada a 400°C são encontrados picos característicos da estrutura anatase, conforme citado por Chaves et al. (2016), em 147 cm^{-1} , 516 cm^{-1} e 634 cm^{-1} , respectivamente, $E_g^1(A)$, relacionado a vibração de alongamento simétrica do O–Ti–O, $A_g^1(A)$, referente a vibração de flexão antissimétrica, e $E_g^2(A)$. Estes picos se repetem nas demais curvas. Após calcinação das amostras a 500°C e 650°C é observado em 395 cm^{-1} outro pico relacionado à anatase, sendo este relativo à vibração de flexão simétrica do O–Ti–O.

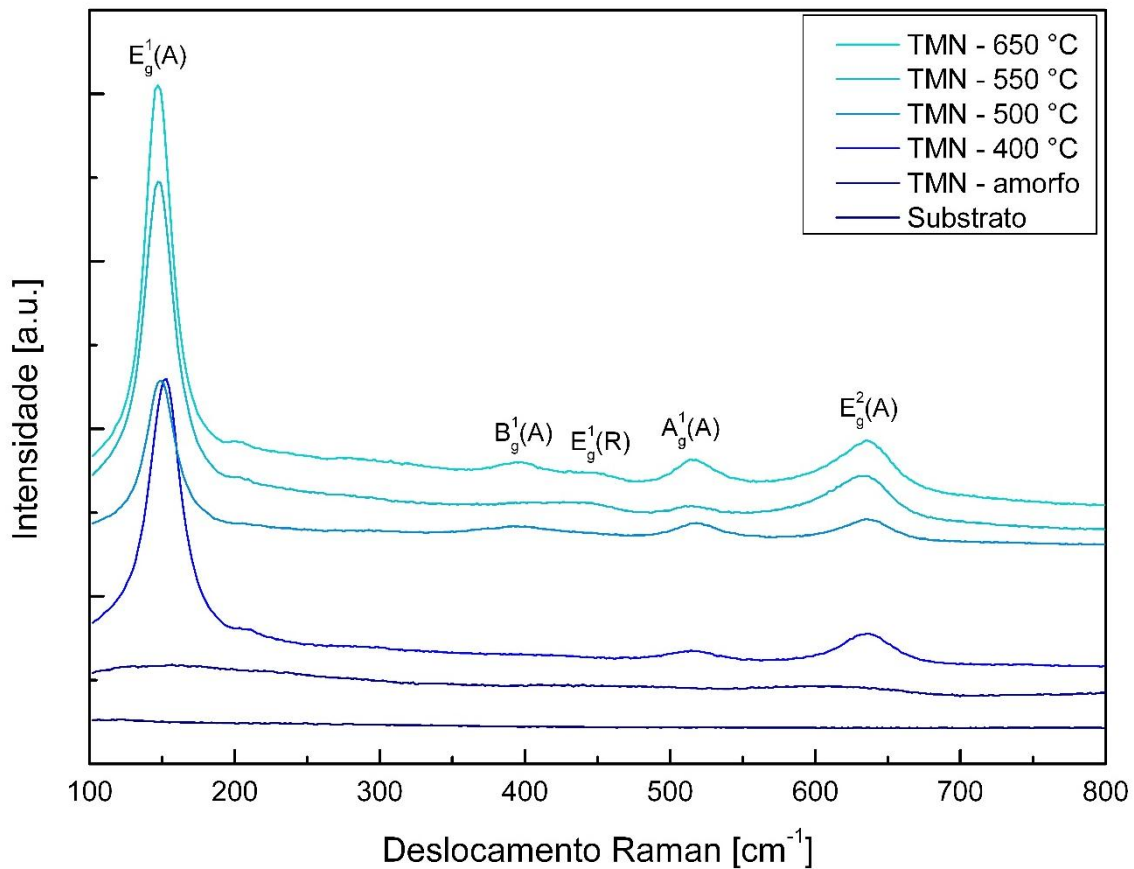
Variações nas curvas que representem a estrutura rutilo são observadas, somente, após a calcinação a temperaturas superiores a 550°C , com o surgimento de picos pouco intensos em 445 cm^{-1} .

Figura 34 - Imagem FE-MEV mostrando a superfície de topo da liga Ti10Mo8Nb após oxidação anódica em eletrólito formado pela adição de 2,7 g de NH_4F a cada um litro da solução glicerol/água (1:1, em volume), sob tensão de 20 V durante 3 horas e calcinadas a (a) 400 °C, (b) 450 °C, (c) 500 °C, (d) 550 °C, (e) 600 °C e (f) 650 °C.



Fonte: Autor

Figura 35 - Espectros Raman da liga Ti10Mo8Nb após a anodização e calcinação.



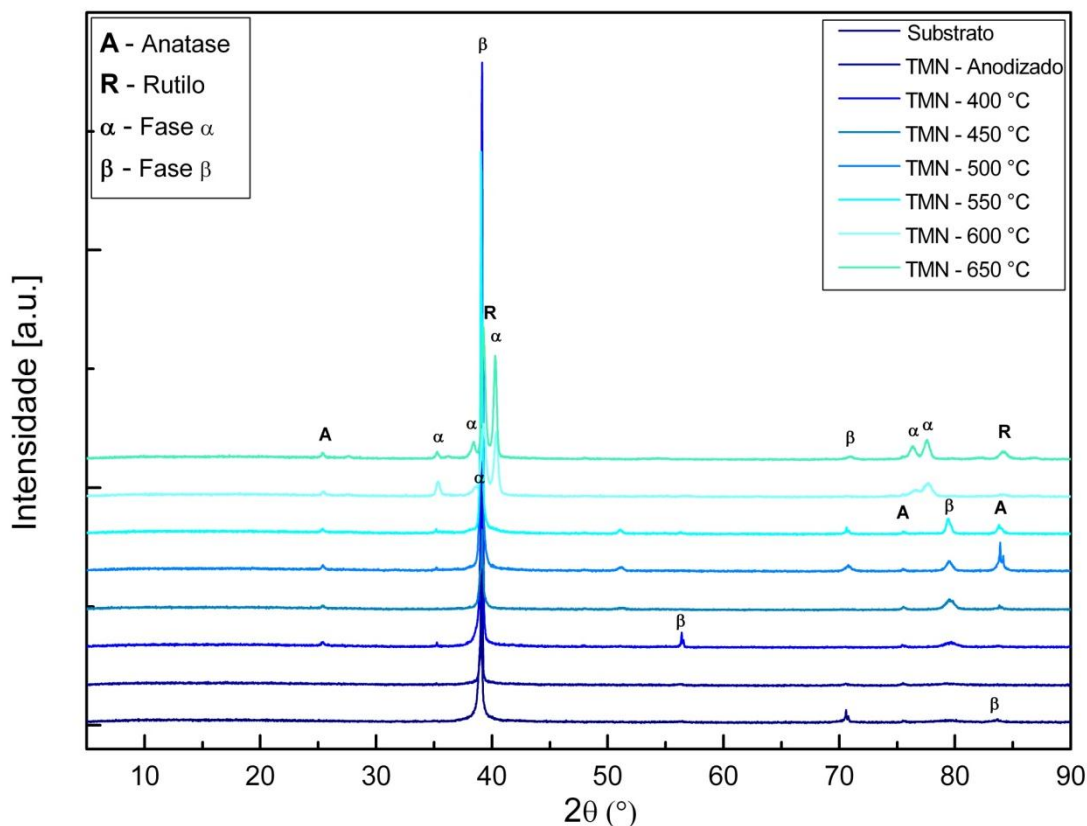
Fonte: Autor

Chaves et al. (2016) ao analisar a superfície da liga Ti7.5Mo após anodização também encontrou espectros Raman similares, com picos relacionados a fase anatase. Somente após calcinação a temperaturas superiores a 400°C, houve surgimento de picos característicos da estrutura rutilo somente a 800 °C.

A mesma relação entre temperatura de calcinação e as estruturas do óxido são encontradas nos difratogramas exibidos na figura 36. Picos característicos da fase rutilo são encontrados apenas após tratamento térmico em temperaturas superiores a 500 °C.

Quando comparado o efeito da temperatura com análise da difração de raios X as interpretações entre os resultados obtidos neste trabalho e os de Chaves et al. (2016) também são semelhantes, com a evidência de picos indexados com rutilo somente a partir temperaturas mais elevadas de calcinação, corroborando com os resultados obtidos por espectroscopia Raman.

Figura 36 – Difratoograma de raios X da liga Ti10Mo8Nb após anodização e calcinação.



Fonte: Autor

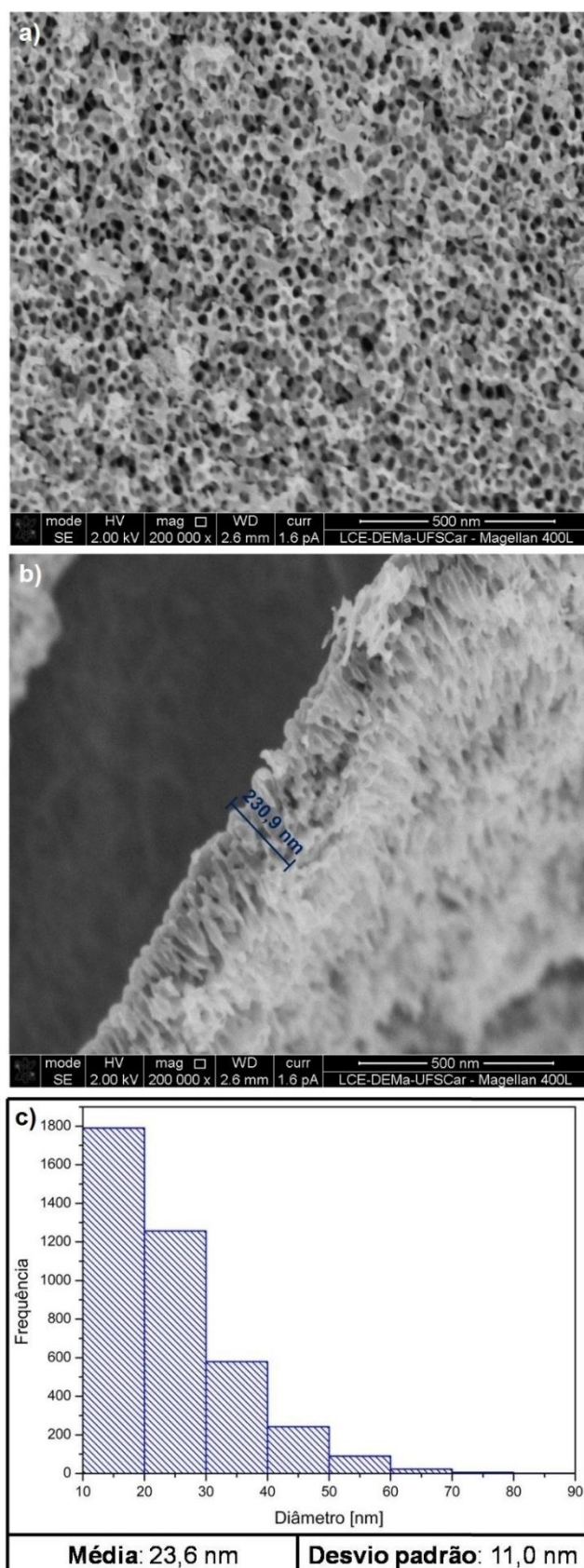
As transformações na estrutura do substrato também foram observadas. A liga que inicialmente apresentava somente fase β , exibiu picos relativos à estrutura α após a calcinação das amostras, surgindo novos picos com o aumento da temperatura e esse processo se intensifica a partir dos 600 °C.

A partir destas análises se optou por dar prosseguimento ao estudo utilizando amostras calcinadas a 450 °C. Essa mesma temperatura foi adotada por estudos anteriores do grupo para a liga Ti7,5Mo apresentando excelentes resultados para nanotubos de TiO₂ (ESCADA; NAKAZATO; CLARO, 2013; ESCADA; CHAVES; CLARO, 2016).

A figura 37 mostra imagens de topo e vista lateral obtidas em FE – MEV da superfície após calcinação a 450 °C, além do histograma com as medidas do diâmetro interno dos poros. O tratamento resultou em poros com diâmetro em torno de 23 nm e espessura da camada de cerca de 200 nm.

Uma morfologia similar foi obtida recentemente em um estudo realizado por Jin et al. (2016) para o TiCP, sendo verificada também a presença de anatase após a calcinação a 450 °C por 1 h.

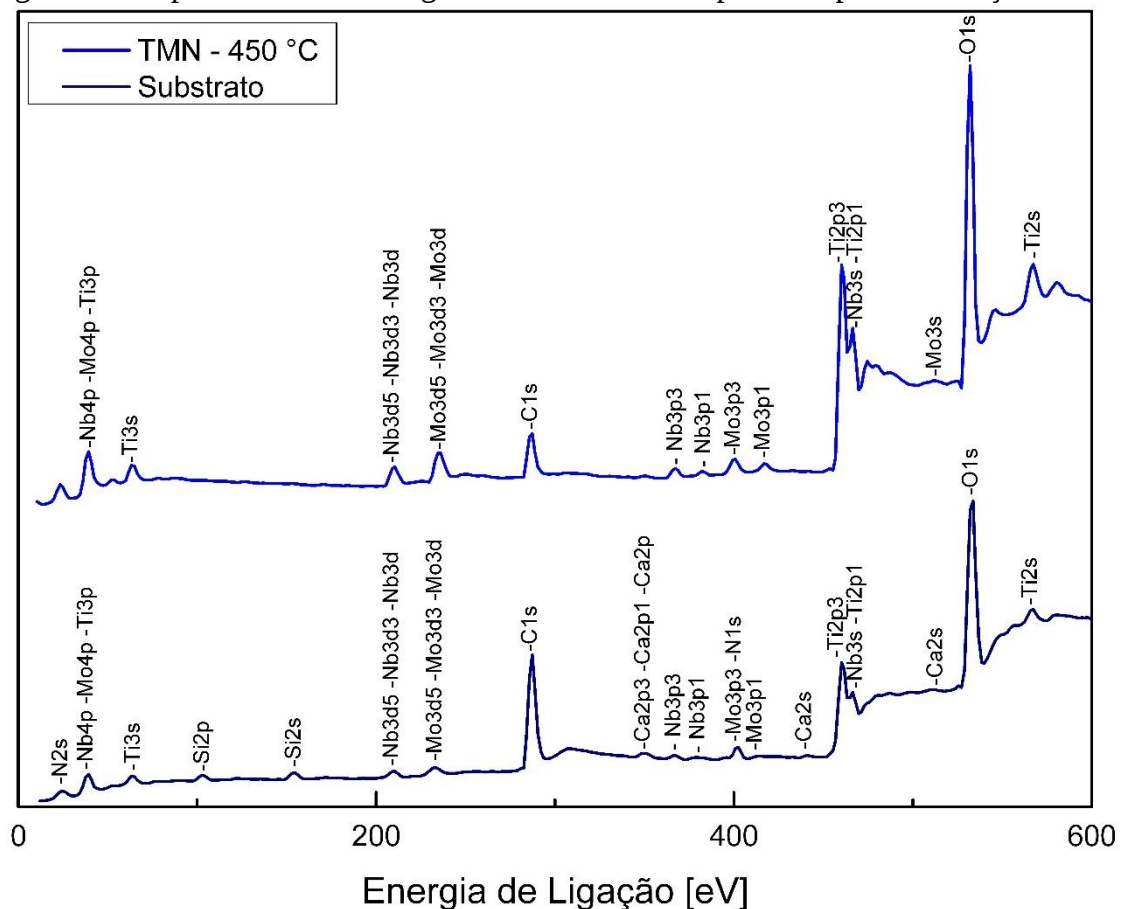
Figura 37– Imagens obtidas por FE – MEV da superfície da liga Ti10Mo8Nb após oxidação anódica e calcinação a 450 °C, vistas de (a) topo e (d) lateral, e (c) histograma dos diâmetros internos dos poros.



Fonte: Autor

Para conhecimento da composição química da superfície das amostras após tratamento de superfície foi realizada espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (figura 38), onde se constatou a presença de óxidos de titânio, molibdênio e nióbio. Estes óxidos já eram observados na superfície da amostra anteriormente a qualquer tratamento, porém após o crescimento da anodização e calcinação foi observado aumento da intensidade dos picos relacionados aos óxidos e diminuição de picos de contaminantes.

Figura 38 - Espectro do XPS da liga Ti10Mo8Nb e da superfície após anodização.



Fonte: Autor.

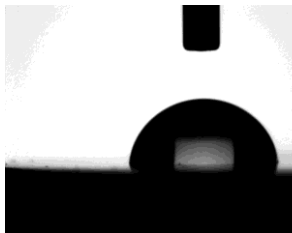
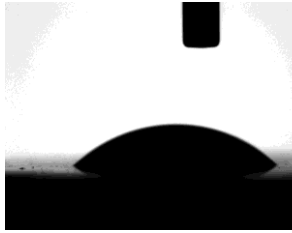
É esperado que essas superfícies exibam baixo ângulo de contato e elevada energia de superfície devido a sua topografia.

O ângulo de contato é um indicativo do espalhamento de um fluido sobre uma superfície e quanto menor esse valor, maior o é caráter hidrofílico da superfície. A análise da molhabilidade por meio da medida do ângulo de contato pode ser influenciada pela heterogeneidade topográfica da superfície, além de medir apenas um tipo de interação, polar ou apolar. Outro método mais completo, que leva em consideração essas duas interações é a

medida da energia de superfície. Neste trabalho, foi utilizado água deionizada e etilenoglicol. Quanto maior a energia, mais hidrofílico é o material.

O quadro 10 apresenta os valores do ângulo de contato entre a superfície da amostra e água deionizada e a energia de superfície total.

Quadro 10 – Ângulo de contato entre a superfície da amostra e água deionizada e energia de superfície total, com a utilização de água deionizada e etilenoglicol.

Amostra	Ângulo de contato (°)	Aspecto da gota	Energia de superfície (mJ/m ²)
Substrato	72,03 ± 9,31		36,94 ± 1,5
Camada porosa amorfa	46,94 ± 5,34		53,93 ± 0,95
Camada porosa calcinada	12,39 ± 5,22		64,92 ± 2,38

Fonte: Autor.

O tratamento de oxidação anódica realizado na liga Ti10Mo8Nb apresentou ótimos resultados quando comparado com a superfície sem tratamento, com um ângulo de contato seis vezes menor, utilizando água deionizada, 72° e 12,4°, respectivamente,

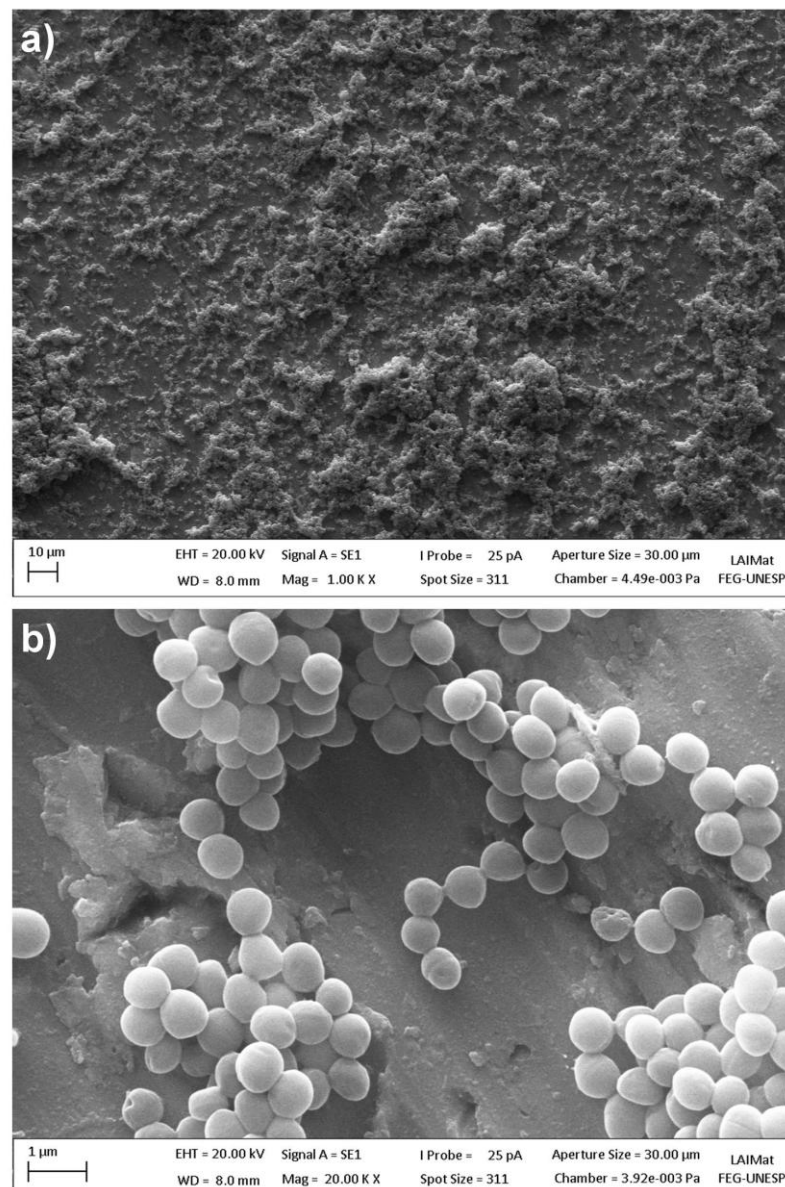
As medidas de energia de superfície confirmaram os resultados encontrados pela medida de ângulo de contato. A energia de superfície após os tratamentos foi aproximadamente duas vezes maior que a da liga, 65 mJ/m² e 35 mJ/m².

4.3 ESTUDOS *IN VITRO*

Nas figuras 39 e 40 é possível observar as imagens da superfície das amostras após os estudos *in vitro* para avaliar a adesão bacteriana (*S. epidermidis*). A análise estatística mostrou diferença significativa entre os grupos ($P < 0,001$ %) (Figura 41) o que levou a concluir que houve uma menor adesão bacteriana nas superfícies nanoporosas.

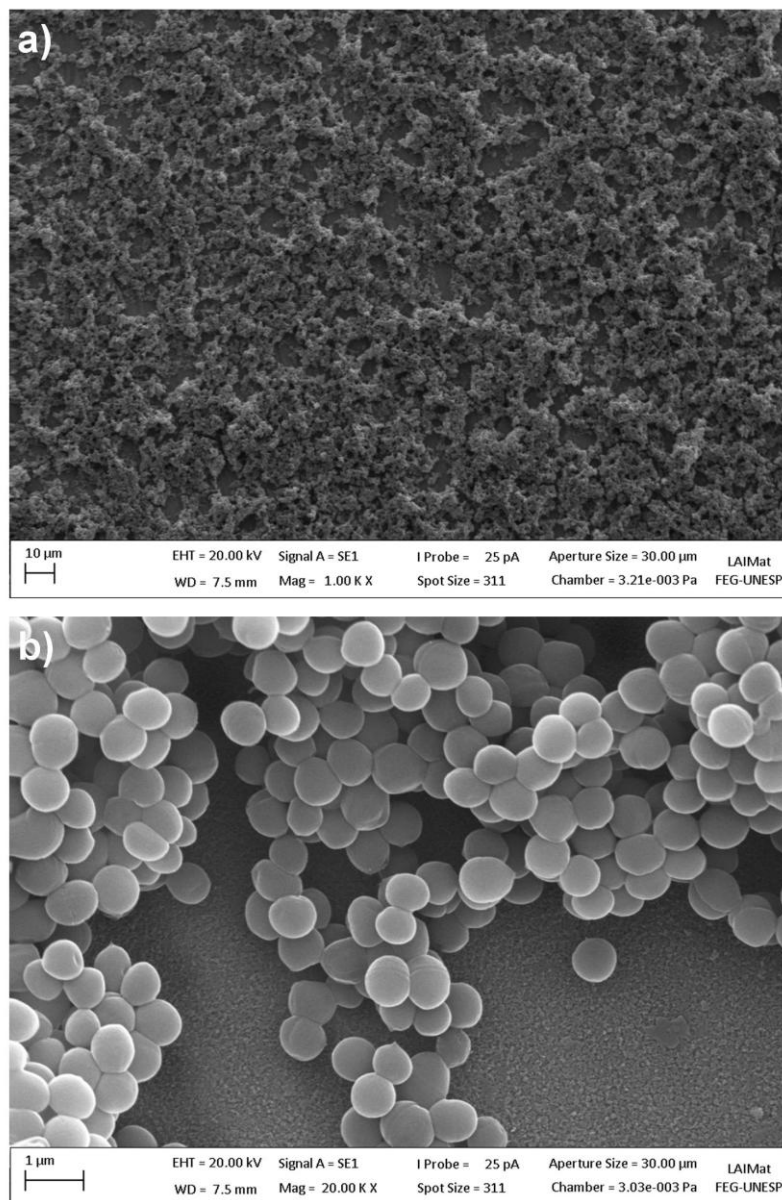
Resultados similares foram verificados por Li et al. (2013) na análise de superfície contendo nanotubos de diâmetros na faixa de 50 a 200 nm. Os autores verificaram que quanto maior a área superficial específica menor a adesão bacteriana.

Figura 39 – Imagem obtida por MEV após cultura da bactéria *S. epidermidis* sobre a superfície lixada da liga Ti10Mo8Nb, com aumento de (a)1000X e (b)20000X.



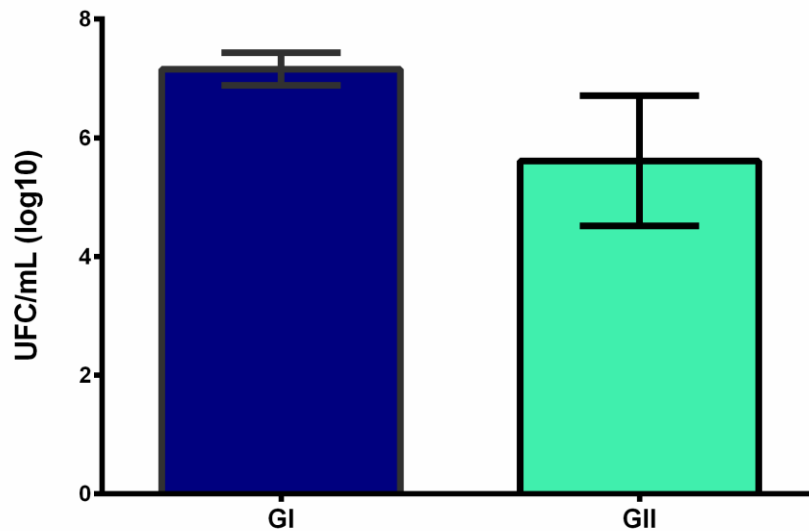
Fonte: Autor

Figura 40 - Imagem obtida por MEV após cultura da bactéria *S. epidermidis* sobre a superfície lixada da liga Ti10Mo8Nb após anodização e calcinação, com aumento de (a)1000X e (b)20000X.



Fonte: Autor

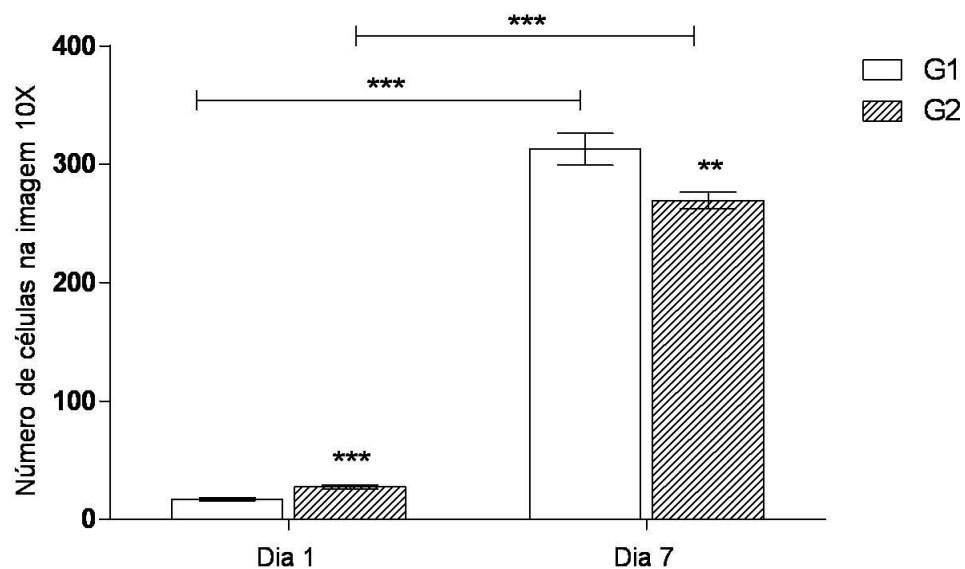
Figura 41 – Concentração de unidades formadoras de colônias após incubação da bactéria *S. epidermidis* sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb lixada (GI) e anodizada (GII).



Fonte: Autor

O efeito da superfície nanoporosa na proliferação das células adiposas (ADSC) foi investigado nos dias 1 e 7 (Figuras 42, 43 e 44). Os resultados mostraram que houve a proliferação celular após 7 dias de cultura para os dois grupos avaliados, superfície lisa (G1) e superfície nanoporosa (G2).

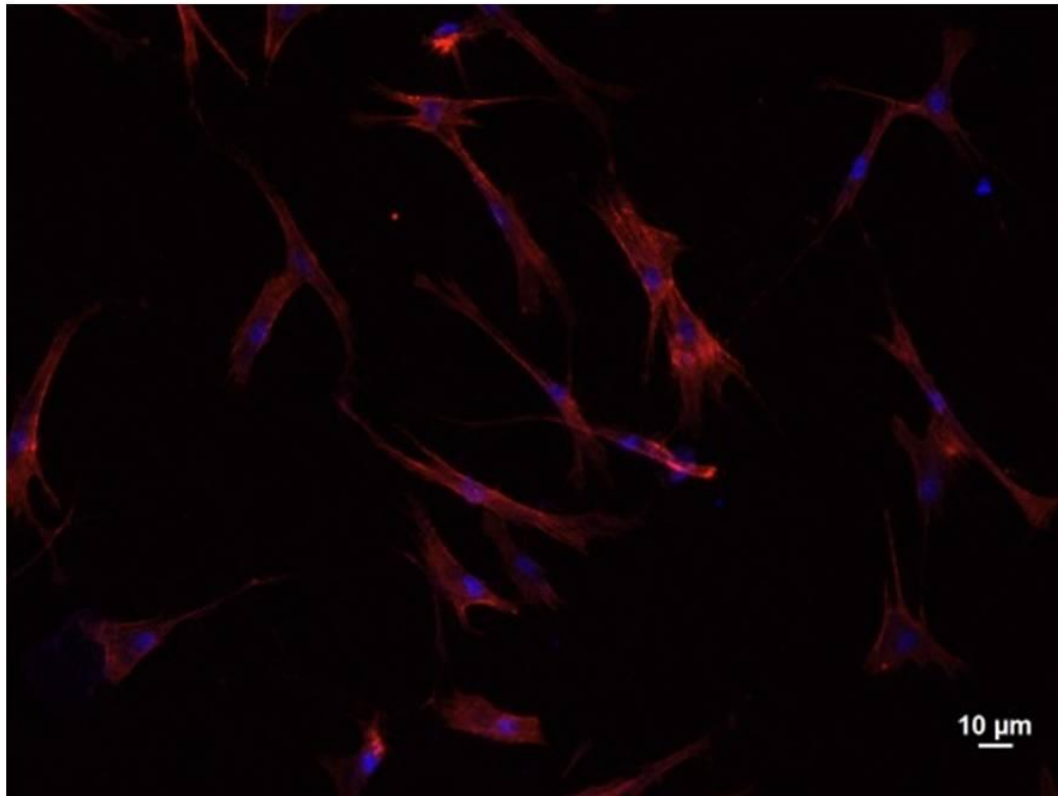
Figura 42 – Contagem de células ADSC aderidas sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb lisa (G1) e anodizada (G2). (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney para amostras independentes, software SPSS 13.0.



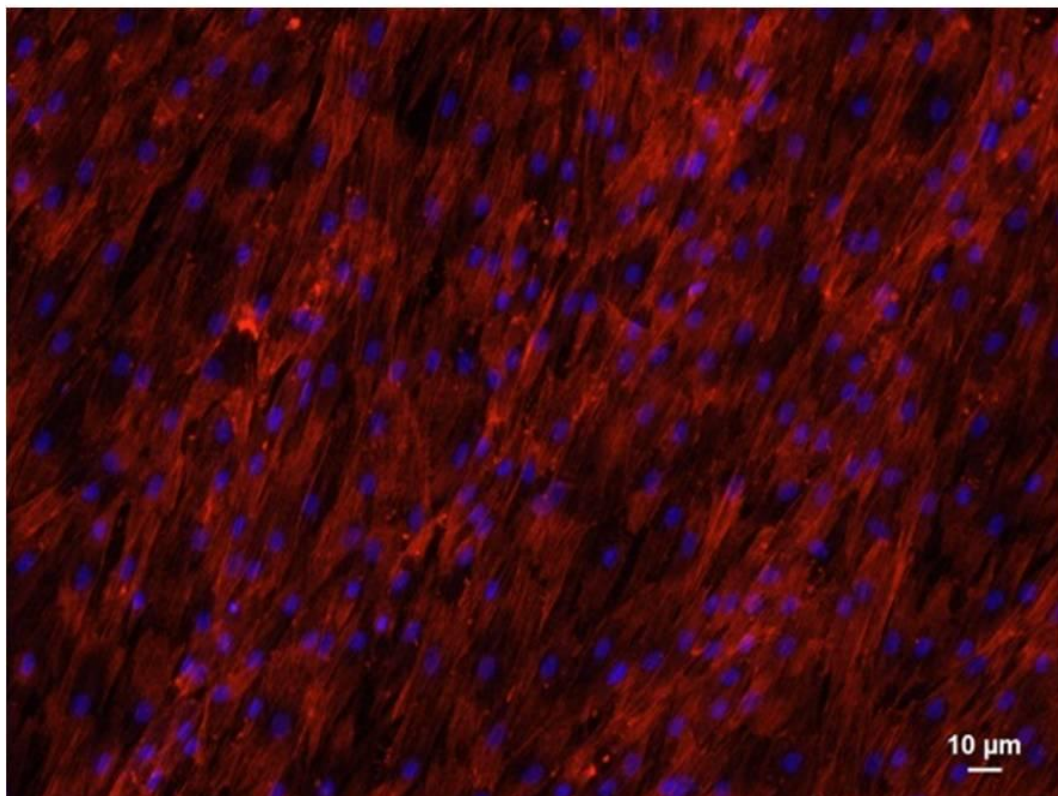
Fonte: Autor

Figura 423 – Imagens de microscopia de fluorescência de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) com DAPI sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb lisa.

DIA 1



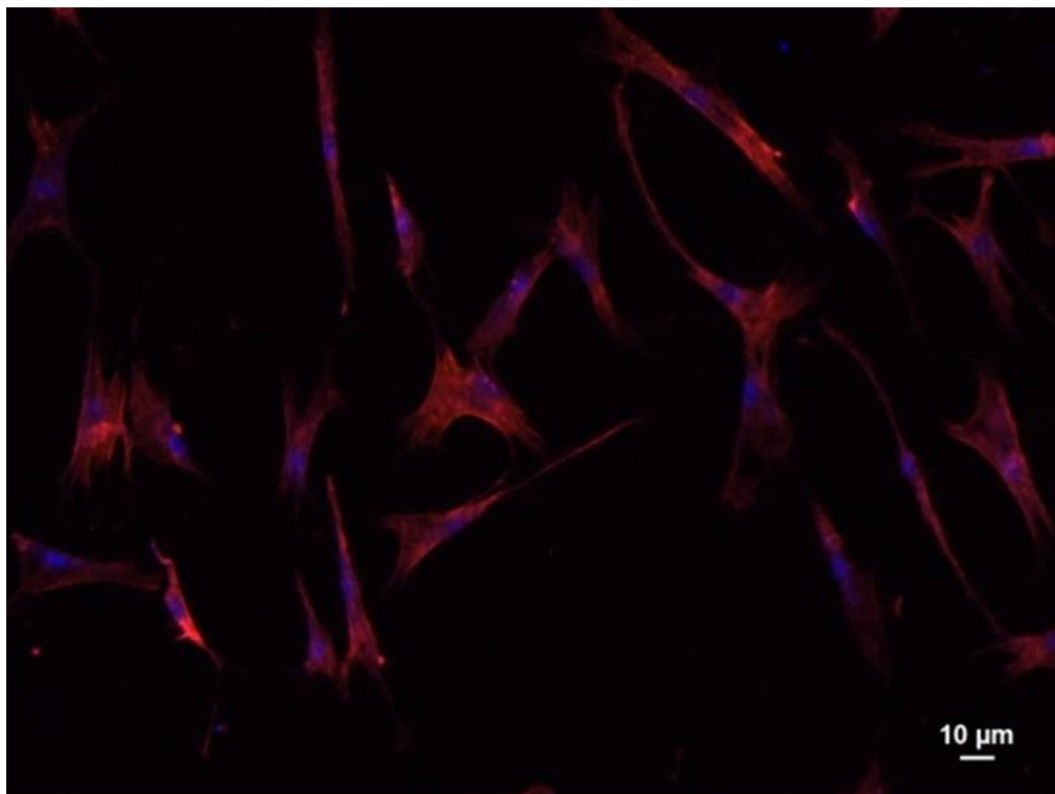
DIA 7



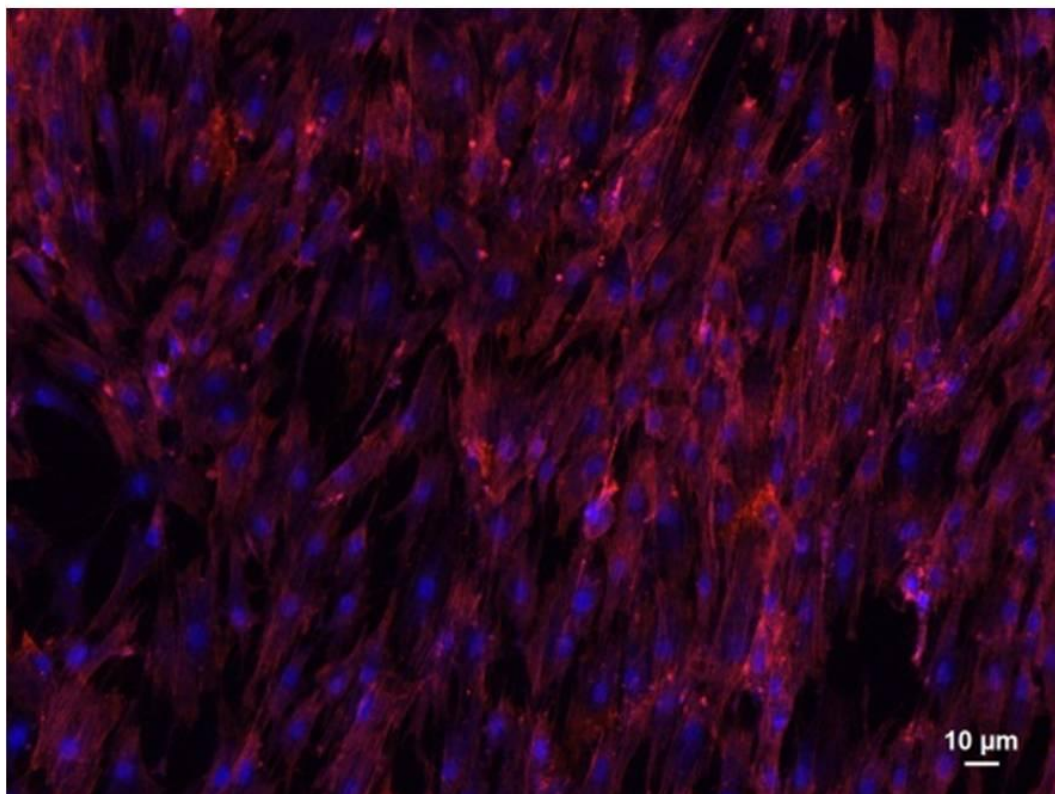
Fonte: Autor

Figura 434 – Imagens de microscopia de fluorescência de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) com DAPI sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb anodizada.

DIA 1



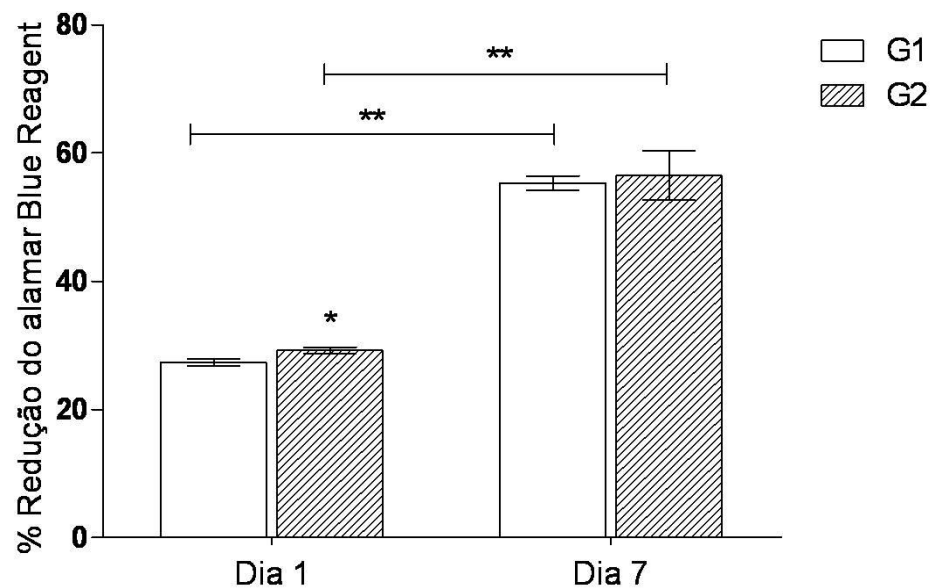
DIA 7



Fonte: Autor

Os resultados da viabilidade celular, avaliada por meio da porcentagem de redução do reagente *Alamar Blue* a partir da atividade mitocondrial da célula, mostraram um aumento da atividade celular no dia 7 confirmando a proliferação celular (Figura 45).

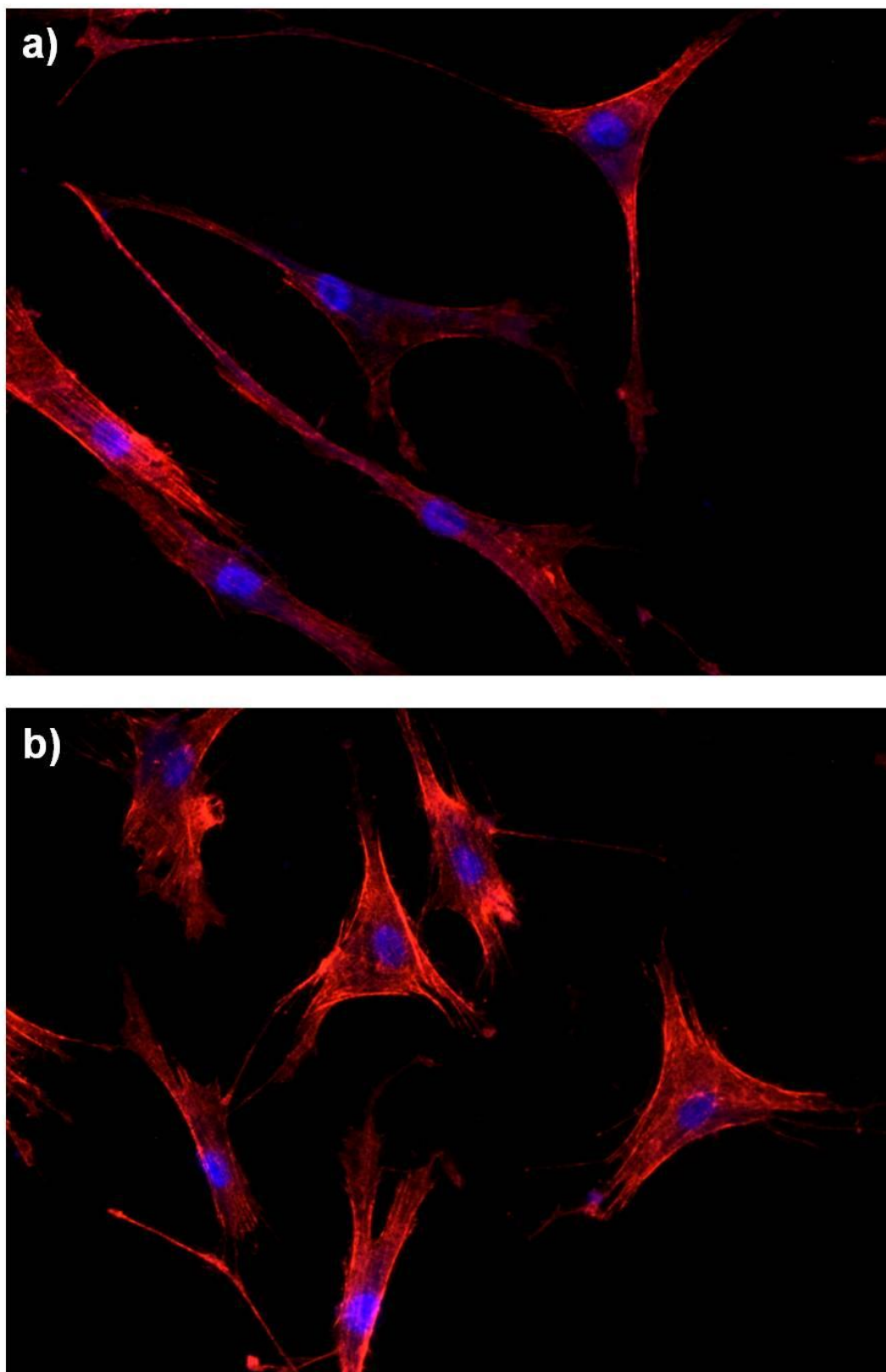
Figura 45 – Viabilidade celular por meio do teste *Alamar Blue* de células ADSC sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb lisa (G1) e anodizada (G2). (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney para amostras independentes, software SPSS 13.0.



Fonte: Autor

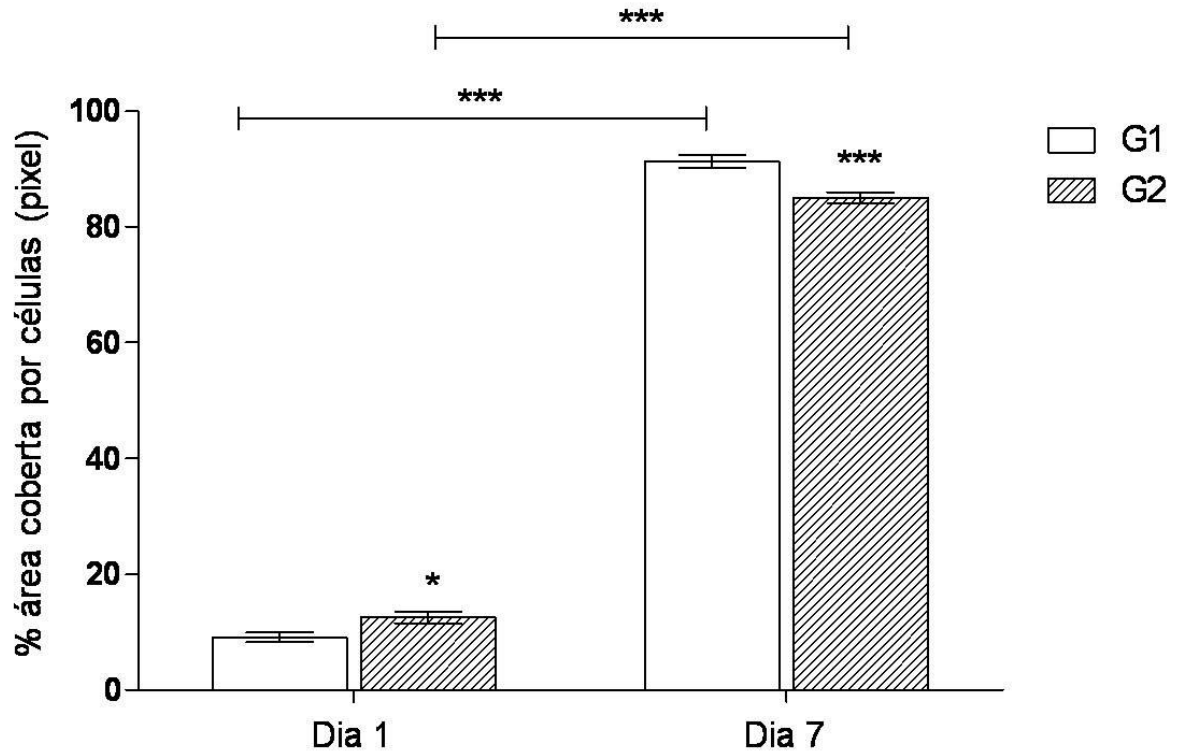
Um fato importante a ser destacado é a morfologia da célula (Figura 46). É nítida a diferença na forma das células crescidas sobre a superfície lisa da liga Ti10Mo8Nb e na superfície nanoporosa. As células apresentaram forma alongada na superfície lisa, enquanto a extensão das filopodias pode ser observada na superfície nanoestruturada. Essa alteração na morfologia leva a uma diferença na cobertura da superfície. Formas alongadas levam a um maior espalhamento (Figura 47) o que não necessariamente implicará em maior adesão, pois as células podem estar apenas sobrepostas. Na literatura, a discussão sobre a adesão celular em superfícies nanoestruturadas é muito divergente, sendo a maioria dos estudos focados na adesão de células mesenquimais na superfície de ligas contendo nanotubos (MARINI et al. 2015).

Figura 446 – Morfologia das células adiposas (ADSC) após 1 dia de cultura sobre a superfície (a) lisa e (b) nanoporosa da liga Ti10Mo8Nb.



Fonte: Autor

Figura 457 – Espalhamento das células ADSC sobre a superfície da liga Ti10Mo8Nb lisa (G1) e anodizada (G2). (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$ utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney para amostras independentes, software SPSS 13.0.



Fonte: Autor

5 CONCLUSÃO

O objetivo geral deste trabalho foi à modificação da superfície da liga experimental Ti10Mo8Nb por oxidação anódica para aplicação biomédica. Por meio dos resultados obtidos foi possível concluir:

- a) A utilização de molibdênio e nióbio como elementos de liga resultou em uma diminuição da temperatura β -transus para cerca de 600 °C.
- b) A liga Ti10Mo8Nb após processamento e tratamento térmico apresentou somente fase β .
- c) A oxidação anódica em eletrólito formado por glicerol e H₂O (1:1, em vol.) com adição de 0,27 % (m/v) resultou na obtenção de uma superfície nanoporosa.
- d) A camada de TiO₂ apresentou estabilidade térmica em relação a morfologia e a presença dos óxidos de titânio, molibdênio e nióbio nas superfícies, comprovada a partir dos estudos de espectroscopia .
- e) A calcinação resultou em uma estrutura anatase do TiO₂ nanoporoso até a temperatura de 500 °C.
- f) O caráter hidrofílico da liga verificado após o tratamento de superfície resultando em adesão e proliferação celular.
- g) A elevada área superficial específica ocasionou menor adesão bacteriana.

Dessa forma, a liga Ti10Mo8Nb contendo nanoporos em sua superfície apresenta viabilidade para aplicação biomédica em situações em que superfícies nanotubulares não são indicadas devido a sua configuração.

REFERÊNCIAS

- ALI, S. H. R.; ALMAATOQ, M. M. A.; MOHAMED, A. S. A. Classifications, surface characterization and standardization of nanobiomaterials. **International Journal of Engineering & Technology**, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 187-199, 2013.
- ALMEIDA, L. H. et al. Corrosion resistance of aged Ti–Mo–Nb alloys for biomedical applications. **Journal of Alloys and Compounds**, [S.l.], v. 615, p. S666-S669, dez. 2014.
- ASSEFPOUR-DEZFULY, M.; VLACHOS, C.; ANDREWS, E. H. Oxide morphology and adhesive bonding on titanium surfaces. **Journal of materials science**, [S.l.], v. 19, n. 11, p. 3626-3639, nov. 1984.
- ATEFYEKTA, S. et al. Antimicrobial performance of mesoporous titania thin films: role of pore size, hydrophobicity, and antibiotic release. **International journal of nanomedicine**, [S.l.], v. 11, p. 977, 2016.
- BAGNO, A.; DI BELLO, C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. **Journal of materials science: materials in medicine**, [S.l.], v. 15, n. 9, p. 935-949, set. 2004.
- BAI, Y. et al. The effect of annealing temperatures on surface properties, hydroxyapatite growth and cell behaviors of TiO₂ nanotubes. **Surface and Interface Analysis**, [S.l.], v. 43, n. 6, p. 998-1005, 2011.
- BEHERA, M. et al. Effect of cooling rate on mechanism of $\beta \rightarrow \alpha$ phase transformation on continuous cooling in Ti–5Ta–1,8 alloy. **Journal of Alloys and Compounds**, [S.l.], v. 553, p. 59-68, mar. 2013.
- CAPELLATO, P. et al. Fibroblast functionality on novel Ti 30Ta nanotube array. **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 32, n. 7, p. 2060-2067, out. 2012.
- CHAVES, J. M. et al. Characterization of the structure, thermal stability and wettability of the TiO₂ nanotubes growth on the Ti–7.5 Mo alloy surface. **Applied Surface Science**, [S.l.], v. 370, p. 76-82, maio 2016.
- CHELARIU, R. et al. Metastable beta Ti–Nb–Mo alloys with improved corrosion resistance in saline solution. **Electrochimica Acta**, [S.l.], v. 137, p. 280-289, ago. 2014.
- CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, [S.l.], v. 87, p. 1-57, jan. 2015.
- COLON, G.; WARD, B. C.; WEBSTER, T. J. Increased osteoblast and decreased Staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO₂. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [S.l.], v. 78, n. 3, p. 595-604, 2006.
- CRAWFORD, G. A.; CHAWLA, N. Porous hierarchical TiO₂ nanostructures: processing and microstructure relationships. **Acta Materialia**, [S.l.], v. 57, n. 3, p. 854-867, 2009.

DUAN, K.; WANG, R. Surface modifications of bone implants through wet chemistry. **Journal of materials chemistry**, [S.l.], v. 16, n. 24, p. 2309-2321, abr. 2006.

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

ESCADA, A. L. A. **Preparação de Superfície Bioativa na Liga Ti-7,5Mo para uso em Odontologia**. 2009, 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Guaratinguetá, 2009.

ESCADA, A. L.A.; CHAVES, J. A. M.; CLARO, A. P. R. A. Surface Modification of the Alloy Ti-7.5Mo by Anodization for Biomedical Applications. In: **Materials Science Forum**. Trans Tech Publications. p. 913-917, 2016.

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

FENG, X. J. et al. Electrochemical formation of self-organized anodic nanotube coating on Ti-28Zr-8Nb biomedical alloy surface. **Acta Biomaterialia**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 318-323, mar. 2008.

FERREIRA, C. P. et al. Effects of substrate microstructure on the formation of oriented oxide nanotube arrays on Ti and Ti alloys. **Applied Surface Science**, [S.l.], v. 285, p. 226-234, nov. 2013.

FINCH, J. The ancient origins of prosthetic medicine. **The Lancet**, [S.l.], v. 377, n. 9765, p. 548-549, fev. 2011.

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

FORNELL, J. et al. Anodic formation of self-organized Ti (Nb, Sn) oxide nanotube arrays with tuneable aspect ratio and size distribution. **Electrochemistry Communications**, [S.l.], v. 33, p. 84-87, ago. 2013.

GEETHA, Ma et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review. **Progress in Materials science**, [S.l.], v. 54, n. 3, p. 397-425, maio 2009.

GITTENS, R. A. et al. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants. **Acta biomaterialia**, [S.l.], v. 10, n. 8, p. 3363-3371, 2014.

HENCH, Larry L.; WILSON, June (Ed.). **An introduction to bioceramics**. Singapore: World Scientific, 1993. Disponível em: <goo.gl/teI7Hg>. Acessado em: 12 set. 2016.

IGLESIAS-RUBIANES, L. et al. Ionic transport in anodically oxidized Al/W layers. **Journal of The Electrochemical Society**, [S.l.], v. 149, n. 2, p. B23-B26, 2002.

JAROENWORALUCK, A. et al. Macro, micro and nanostructure of TiO₂ anodized films prepared in a fluorine-containing electrolyte. **Journal of Materials Science**, [S.l.], v. 42, n. 16, p. 6729-6734, ago. 2007.

JAROENWORALUCK, A. et al. Nucleation and early growth of anodized TiO₂ film. **Journal of Materials Research**, [S.l.], v. 23, n. 08, p. 2116-2124, ago. 2008.

JESSENSKY, O.; MÜLLER, F.; GÖSELE, U. Self-organized formation of hexagonal pore structures in anodic alumina. **Journal of the Electrochemical Society**, [S.l.], v. 145, n. 11, p. 3735-3740, 1998.

JIN, M. et al. Enhanced bond strength and bioactivity of interconnected 3D TiO₂ nanoporous layer on titanium implants. **Surface and Coatings Technology**, [S.l.], v. 304, p. 459-467, 2016.

JIN, M. et al. Fabrication and characterization of anodic oxide nanotubes on TiNb alloys. **Rare Metals**, [S.l.], v. 35, n. 2, p. 140-148, fev. 2016.

KATTI, K. S. Biomaterials in total joint replacement. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 39, n. 3, p. 133-142, dez. 2004.

KELLER, F.; HUNTER, M. S.; ROBINSON, D. L. Structural features of oxide coatings on aluminum. **Journal of the Electrochemical Society**, [s.l.], v. 100, n. 9, p. 411-419, 1953.

KIM, H. Y. et al. Martensitic transformation, shape memory effect and superelasticity of Ti-Nb binary alloys. **Acta Materialia**, [S.l.], v. 54, n. 9, p. 2419-2429, mar. 2006.

KELLY, R. G. et al. Passivity of Fe in anhydrous propylene carbonate. **Journal of the Electrochemical Society**, [S.l.], v. 136, n. 11, p. 3262-3269, 1989.

KIM, E. et al. Formation of titanium dioxide nanotubes on Ti-30Nb-xTa alloys by anodizing. **Thin Solid Films**, [S.l.], v. 549, p. 141-146, ago. 2013.

KONATU, Reginaldo Toshihiro. **Análise da rota de processamento da liga Ti-30T visando a aplicação biomédica**. 2014. 54 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Guaratinguetá, 2014.

KOWALSKI, D.; KIM, D.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes, nanochannels and mesosponge: self-organized formation and applications. **Nano Today**, [S.l.], v. 8, n. 3, p. 235-264, 2013.

KULKARNI, Mukta et al. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. **Nanomedicine**, [S.l.], v. 111, p. 111-136, 2014.

LEYENS, C.; PETERS, M (Eds.). **Titanium and titanium alloys**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, p. 512.

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

LI, S. et al. Anodization fabrication of highly ordered TiO₂ nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry C**, [S.l.], v. 113, n. 29, p. 12759-12765, jun. 2009.

LI, Y. et al. Cytotoxicity of titanium and titanium alloying elements. **Journal of dental research**, [S.l.], v. 89, n. 5, p. 493-497, 2010.

LIANG, Y. Q. et al. Characterization of self-organized TiO₂ nanotubes on Ti-4Zr-22Nb-2Sn alloys and the application in drug delivery system. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 461-467, mar. 2011.

LIU, N. et al. A review on TiO₂-based nanotubes synthesized via hydrothermal method: formation mechanism, structure modification, and photocatalytic applications. **Catalysis Today**, [S.l.], v. 225, p. 34-51, abr. 2014.

LECLERE, D. J. et al. Tracer investigation of pore formation in anodic titania. **Journal of the Electrochemical Society**, [S.l.], v. 155, n. 9, p. C487-C494, jul. 2008.

LONG, M.; RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. **Biomaterials**, [S.l.], v. 19, n. 18, p. 1621-1639, set. 1998.

LÜTJERING, G.; WILLIAMS, J. C. **Titanium**. 2nd ed. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 442.

MACAK, J. M. et al. TiO₂ nanotubes: self-organized electrochemical formation, properties and applications. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 3-18, fev. 2007.

MARINI, F. et al. Osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on nanostructured Ti6Al4V and Ti13Nb13Zr. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 224, 2015.

MASUDA, H.; FUKUDA, K. Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. **Science**, [S.l.], v. 268, n. 5216, p. 1466, jun. 1995.

MAZARE, A. et al. Calcination condition effect on microstructure, electrochemical and hemolytic behavior of amorphous nanotubes on Ti6Al7Nb alloy. **Surface and Coatings Technology**, [S.l.], v. 252, p. 87-92, ago. 2014.

MINAGAR, S. et al. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys. **Journal of biomedical materials research Part A**, [S.l.], v. 101, n. 9, p. 2726-2739, 2013.

MOHAN, L.; ANANDAN, C.; RAJENDRAN, N. Electrochemical behavior and effect of heat treatment on morphology, crystalline structure of self-organized TiO₂ nanotube arrays on Ti-6Al-7Nb for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 50, p. 394-401, maio 2015.

MOHAPATRA, S. K. et al. A novel method for the synthesis of titania nanotubes using sonoelectrochemical method and its application for photoelectrochemical splitting of water. **Journal of Catalysis**, [S.l.], v. 246, n. 2, p. 362-369, mar. 2007.

NIINOMI, M.; NAKAI, M. Titanium-based biomaterials for preventing stress shielding between implant devices and bone. **International journal of biomaterials**, [S.l.], v. 2011, 2011.

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

NERLICH, A. G. et al. Ancient Egyptian prosthesis of the big toe. **The Lancet**, [S.l.], v. 356, n. 9248, p. 2176-2179, dez. 2000

NGUYEN, T. T. et al. Enhanced biocompatibility of a pre-calcified nanotubular TiO₂ layer on Ti–6Al–7Nb alloy. **Surface and Coatings Technology**, [S.l.], v. 236, p. 127-134, dez. 2013.

OH, S. et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 106, n. 7, p. 2130-2135, 2009.

PEREIRA, C. A. et al. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. **Lasers in medical science**, [S.l.], v. 26, n. 3, p. 341-348, 2011.

PRABHA, A. Josephine et al. Thermodynamics of $\alpha \rightarrow \beta$ phase transformation and heat capacity measurements in Ti–15at%Nb alloy. **Physica B: Condensed Matter**, [S.l.], v. 406, n. 22, p. 4200-4209, nov. 2011.

PRIDA, V. M. et al. Temperature influence on the anodic growth of self-aligned Titanium dioxide nanotube arrays. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [S.l.], v. 316, n. 2, p. 110-113, set. 2007.

PROSTHETICS. **A history**. Disponível em: <goo.gl/ED8Y2t>/. Acessado em: 12 set. 2016.

PUCKETT, S. D. et al. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. **Biomaterials**, [S.l.], v. 31, n. 4, p. 706-713, 2010.

RAFIEERAD, A. R. et al. Microstructural development and corrosion behavior of self-organized TiO₂ nanotubes coated on Ti–6Al–7Nb. **Ceramics International**, [S.l.], v. 41, n. 9, p. 10844-10855, nov. 2015.

RANGEL, A. L. R.; ESCADA, A. L. A.; CLARO, A. P. R. A. Surface modification of the Ti–15Mo alloy by TiO₂ nanotubes growth for dental applications. **Dental Materials**, [S.l.], n. 29, p. e95-e96, 2013.

RATNER, Buddy D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Academic press, 2004. Disponível em:<goo.gl/3HkajZ>. Acessado em: 12 set. 2016.

REGONINI, D. et al. Factors influencing surface morphology of anodized TiO₂ nanotubes. **Electrochimica Acta**, [S.l.], v. 74, p. 244-253, jul. 2012.

REGONINI, D. et al. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, [S.l.], v. 74, n. 12, p. 377-406, dez. 2013.

SAINI, M. et al. Implant biomaterials: A comprehensive review. **World Journal of Clinical Cases: WJCC**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 52-57, jan. 2015.

SHAH, F. A. et al. Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants—Is one truly better than the other?. **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 62, p. 960-966, maio 2016.

SHANKAR, K. et al. Cation effect on the electrochemical formation of very high aspect ratio TiO₂ nanotube arrays in formamide-water mixtures. **The Journal of Physical Chemistry C**, [S.l.], v. 111, n. 1, p. 21-26, 2007.

SHARMA, C. P. Biomaterials and Artificial Organs: Few Challenging Areas. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, [S.l.], v. 18, n. 2, p. 148-157, 2005.

SIEJKA, J.; ORTEGA, C. An O18 Study of Field-Assisted Pore Formation in Compact Anodic Oxide Films on Aluminum. **Journal of The Electrochemical Society**, [S.l.], v. 124, n. 6, p. 883-891, 1977.

SOBIESZCZYK, S. Surface modifications of Ti and its alloys. **Advances in Materials Sciences**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 29-42, mar. 2010.

SUN, F. et al. A thermo-mechanical treatment to improve the superelastic performances of biomedical Ti–26Nb and Ti–20Nb–6Zr (at.%) alloys. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, [S.l.], v. 4, n. 8, p. 1864-1872, nov. 2011.

VALOTA, A. et al. Influence of applied potential on titanium oxide nanotube growth. **Journal of the Electrochemical Society**, [S.l.], v. 157, n. 12, p. K243-K247, 2010.

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

WANG, J.; LIN, Z. Anodic formation of ordered TiO₂ nanotube arrays: effects of electrolyte temperature and anodization potential. **The Journal of Physical Chemistry C**, [S.l.], v. 113, n. 10, p. 4026-4030, fev. 2009.

YORIYA, S.; BAO, N.; GRIMES, C. A. Titania nanoporous/tubular structures via electrochemical anodization of titanium: effect of electrolyte conductivity and anodization voltage on structural order and porosity. **Journal of Materials Chemistry**, [S.l.], v. 21, n. 36, p. 13909-13912, ago. 2011.

TAVEIRA, L. V. et al. Initiation and Growth of Self-Organized TiO₂ Nanotubes Anodically Formed in NH₄F/(NH₄)₂SO₄ Electrolytes. **Journal of the Electrochemical Society**, [S.l.], v. 152, n. 10, p. B405-B410, 2005.

XU, L. J. et al. The microstructure and properties of Ti–Mo–Nb alloys for biomedical application. **Journal of Alloys and Compounds**, [S.l.], v. 453, n. 1, p. 320-324, abr. 2008.

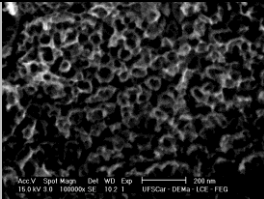
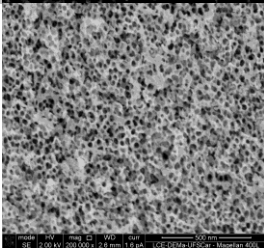
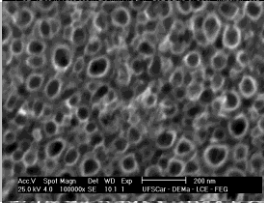
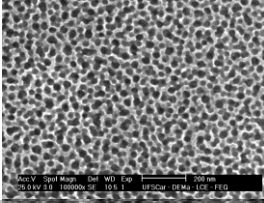
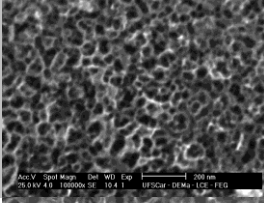
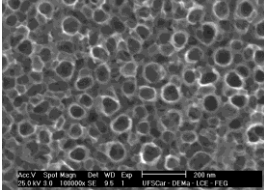
ZHANG, Wande et al. Laser Processing of Natural Biomaterials. In: Schmidt, V.; Belegatis, M. R. (Eds.). **Laser Technology in Biomimetics**. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. cap. 9, p. 237-257. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-41341-4_10>. Acessado em: 12 set. 2016.

ZHANG, X.; WANG, L.; LEVÄNEN, E. Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion. **RscAdvances**, [S.l.], v. 3, n. 30, p. 12003-12020, 2013.

ZWILLING, V. et al. Structure and physicochemistry of anodic oxide films on titanium and TA6V alloy. **Surface and Interface Analysis**, [S.l.], v. 27, n. 7, p. 629-637, jul. 1999.

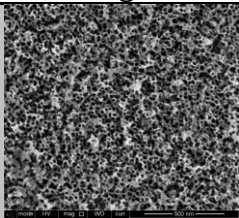
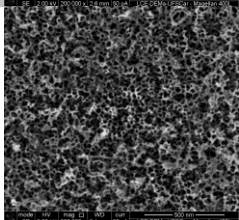
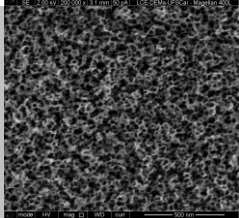
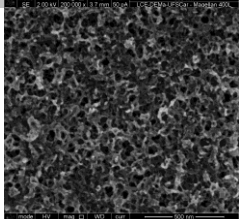
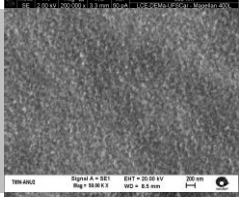
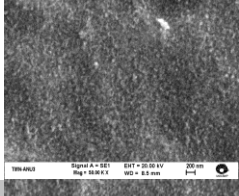
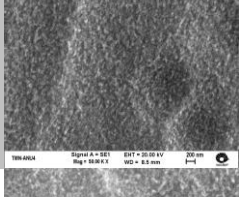
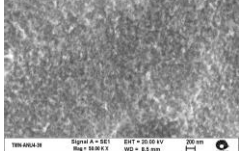
APÊNDICE – Desenvolvimento dos parâmetros de anodização

Quadro 11 – Parâmetros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H₂O (1:1, em vol.) + 0,27% (m/v) de NH₄F.

Eletrólito					
Glicerol e H ₂ O (1:1, em vol.) + 0,27% (m/v) de NH ₄ F					
Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza	Imagem	Observações
20 V	2 h	Lixada	Ultrassom 5 min		Formação de nanotubos apenas na borda
20 V	3 h	Lixada	Ultrassom 5 s		Formação de camada porosa
20 V	3 h	Polida	Ultrassom 5 min		Formação de nanotubos apenas na borda
20 V	6 h	Polida	Ultrassom 5 min		Formação de nanoporos apenas na borda
20 V	12 h	Polida	Ultrassom 5 min		Formação de nanotubos apenas na borda
20 V	24 h	Polida	Ultrassom 5 min		Formação de nanotubos apenas na borda

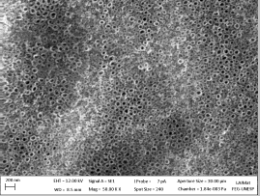
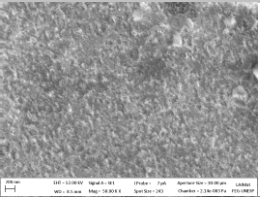
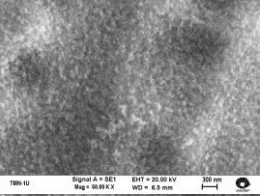
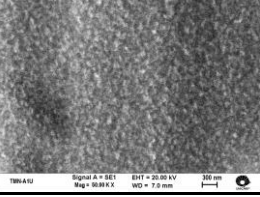
Fonte: Autor

Quadro 12 – Parâmetros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H₂O (3:1, em vol.) + 1,25% (m/v) de NH₄F.

Eletrólito					
Glicerol e H ₂ O (3:1, em vol.) + 1,25 % (m/v) de NH ₄ F					
Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza	Imagem	Observações
20 V	1 h	Ataque ácido	Ultrassom 5 s		Formação de nanoporos interconectados
20 V	1 h	Ataque ácido	Enxágue		Formação de nanoporos interconectados
20 V	1 h	Lixada	Ultrassom 5 s		Formação de nanoporos interconectados
20 V	1 h	Lixada	Enxágue		Formação de nanoporos interconectados
20 V	2 h	Ataque ácido	Ultrassom 5 s		Formação de superfície nanorugosa
20 V	3 h	Ataque ácido	Ultrassom 5 s		Formação de superfície nanorugosa
20 V	4 h	Ataque ácido	Ultrassom 5 s		Formação de superfície nanorugosa
30 V	4 h	Ataque ácido	Ultrassom 5 s		Formação de superfície nanorugosa

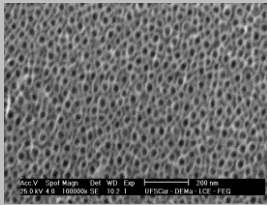
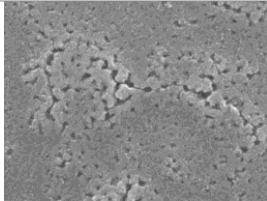
Fonte: Autor

Quadro 13 – Parâmetros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H₂O (1:1, em vol.) + 1,00% (m/v) de NH₄F.

Eletrólito					
Glicerol e H ₂ O (1:1, em vol.) + 1,00% (m/v) de NH ₄ F					
Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza	Imagem	Observações
20 V	1 h	Lixada	Ultrassom 5 min		Obtenção de uma superfície homogênea foi obtida em toda a amostra; não foi possível a reprodutibilidade
20 V	1 h	Lixada	Enxágue		Mesmo resultado que as demais condições
20 V	1 h	Lixada	Ultrassom 5 s		Mesmo resultado que as demais condições
20 V	1 h	Ataque ácido	Ultrassom 5 s		Mesmo resultado que as demais condições

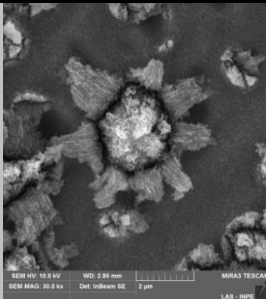
Fonte: Autor

Quadro 14 – Paramêtros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H₂O (9:1, em vol.) + 0,25% (m/v) de NH₄F.

Eletrólito					
Glicerol e H ₂ O (9:1, em vol.) + 0,25 % (m/v) de NH ₄ F					
Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza	Imagem	Observações
20V	24 h	Polida	Ultrassom 5 min		a formação de nanotubos ocorreu apenas na borda da amostra anodizada a 20 V
30V	24 h	Polida	Ultrassom 5 min		Não houve a formação de superfícies nanoestruturadas

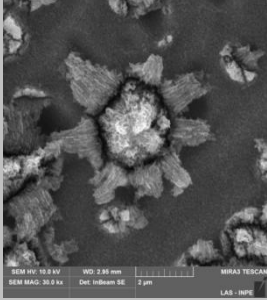
Fonte: Autor

Quadro 15 – Paramêtros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H₂O (1:1, em vol.) + 0,27% (m/v) de NH₄F.

Eletrólito					
1,0 M H ₃ PO ₄ + 0,2 M NH ₄ F					
Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza	Imagem	Observações
20 V	1 h	Lixada	Ultrassom 5 s		Houve a formação de erupções sobre a camada, em formato de flor quando utilizado NH ₄ F

Fonte: Autor

Quadro 16 – Parâmetros utilizados na anodização da liga Ti10Mo8Nb com o eletrólito glicerol e H₂O (1:1, em vol.) + 0,27% (m/v) de NH₄F.

Eletrólito					
1,0 M H ₃ PO ₄ + 0,2 M NaF					
Tensão	Tempo	Superfície	Limpeza	Imagem	Observações
20 V	1 h	Lixada	Ultrassom 5 s		Houve a formação de erupções sobre a camada, em formato de flor quando utilizado NH ₄ F

Fonte: Autor