

UNESP
Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá

Guaratinguetá
2012

PATRICIA CAPELLATO

CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA LIGA Ti-30Ta APÓS
CRESCIMENTO DE NANOTUBOS

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

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Rosifini Alves Claro

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina
Rosifini Alves Rezende

Guaratinguetá
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

C238c	Capellato, Patricia Caracterização da superfície da liga Ti-30Ta após crescimento de nanotubos / Patricia Capellato.- Guaratinguetá : [s.n.], 2012 89 f.: il. Bibliografia: f. 83-89 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2012 Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Rosifini Alves Claro Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende 1. Ligas de titânio 2. Nanotubos I. Título CDU 669.295
-------	--

PATRICIA CAPELLATO

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

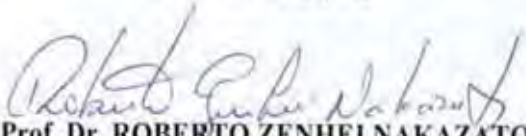
PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
ÁREA: MATERIAIS

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

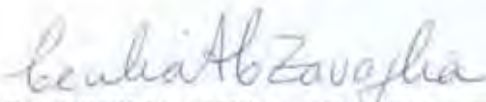

Prof. Dr. Marcelo dos Santos Pereira
Coordenador

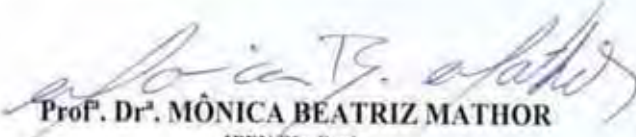
BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO
Orientador / Unesp-Feg


Prof. Dr. ROBERTO ZENHEI NAKAZATO
Unesp-Feg


Prof. Dr. ESTEVÃO TOMOMITSU KIMPURA
Unesp-SJC


Prof. Dr. CECILIA AMELIA DE CARVALHO ZAVAGLIA
UNICAMP


Prof. Dr. MÔNICA BEATRIZ MATHOR
IPEN/São Paulo

Fevereiro de 2012

PATRICIA CAPELLATO

NASCIMENTO	05.03.1973 – SÃO CARLOS / SP
FILIAÇÃO	Armando Vitturi Capellato Jacira Bueno Capellato
1994/1997	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia - Universidade de Taubaté.
1999/1999	Curso de Aperfeiçoamento em Dentística na Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP.
2005/2007	Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, nível de Mestrado, na Faculdade de Engenharia da Universidade de Taubaté.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus que sempre me acompanha
e a minha sobrinha Calliza pois cada sorriso seu é um afago no meu coração.

AGRADECIMENTOS

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

à minha orientadora, *Profa. Dra. Ana Paula Rosifini Alves Claro*. Sem a sua orientação, dedicação e auxílio, o estudo aqui apresentado seria praticamente impossível,

aos meus pais *Armando e Jacira*, que apesar das dificuldades enfrentadas, sempre incentivaram meus estudos,

ao meu irmão e sua esposa, *Thierre e Letícia*, a minha irmã e seu marido, *Camilla e Junior*, *que* me ajudaram cada um a sua maneira nessa conquista,

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

aos professores e técnicos do Laboratório de Materiais e Tecnologia da FEG/UNESP, Manoel Francisco dos S. Filho, Domingos Hasmann Neto, José Manoel Bernardes, Célio José de Souza, Wilson Roberto Monteiro, pela dedicação e cooperação nos trabalhos,

aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FEG/UNESP, Juliana Casella, Maria Cristina Silva de Oliva e Sidney Eustáquio Ramos Rabelo, pela atenção, dedicação e alegria no atendimento,

à secretária da pós-graduação Regina Célia Galvão Faria Alves por toda ajuda prestada antes e depois do meu Doutorado sanduiche,

à secretária do Departamento de Materiais e Tecnologia Maria Aparecida Ribeiro Vasconcelos pela gentileza no atendimento,

ao *Prof. Dr. Marcelo dos Santos Pereira*,

ao *Prof. Dr. João Paulo Barros Machado* do Laboratório de Sensores e Materiais - LAS - do Instituto de Pesquisa Espacial (INPE) em São José dos Campos,

ao *Prof. Dr. Ketul Popat* por todo apoio durante meu doutorado sanduiche em Fort Collins- Colorado-EUA,

às colegas Ana Lucia do Amaral Escada e Maria Cândida Magalhães,

à minha amiga Claudia L.da Silva Carvalho e Barbara Smith por toda ajuda, tempo e carinho dispensado.

Este trabalho contou com apoio das seguintes entidades:

- CNPq – PROGRAMA DOUTORADO SANDUICHE- Processo 201271/2010-9
- FAPESP — Projeto Regular 2010/10174-8
- Capes

“...conceda-me a serenidade
para aceitar aquilo que não posso mudar,
a coragem para mudar o que me for possível
e a sabedoria para saber discernir entre as duas...”

Reinhold Niebuhr

CAPELLATO, P. **Caracterização da superfície da liga Ti-30Ta após crescimento de nanotubos**. 2012. 89f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2012.

RESUMO

Titânio CP e a liga Ti6Al4V são amplamente empregados na fabricação de componentes para aplicações biomédicas. No entanto, estes materiais podem causar problemas de saúde em função da liberação de íons metálicos citotóxicos e reabsorção do osso adjacente devido a grande diferença entre o módulo de elasticidade do material e osso. Esses fatores têm levado ao desenvolvimento de novas ligas de titânio e também de novas técnicas de modificação de superfície. Amostras da liga experimental Ti-30Ta na forma de discos com 13 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram empregadas nesse estudo. O processo de anodização foi realizado sob tensão de 15V, 25V e 35V e tempos de 20 e 40 min em eletrólito formado por HF/H₂SO₄ com adição de dimetil sulfoxido (DMSO). A calcinação das amostras foi realizada a 530°C durante 3 h. As superfícies foram avaliadas empregando-se MEV-FEG, EDS e a molhabilidade avaliada com ângulo de contato. Todas as condições avaliadas apresentam superfície hidrofílica. Nanotubos de Ti-30Ta foram obtidos na condição 35V-40 min apresentando 100 nm de comprimento e 80-100 nm de diâmetro. A biocompatibilidade da liga Ti-30Ta com nanotubos foi avaliada após 24 e 72 horas de cultura celular com fibroblastos dérmicos humanos (HDF, neonatal). A adesão e proliferação celular, viabilidade, organização do citoesqueleto e morfologia celular foram investigadas por meio de imagens de microscópio de fluorescência, ensaios bioquímicos e MEV-FEG. Análise celular demonstrou aumento significativo na adesão e proliferação celular, viabilidade, alongamento e produção de matriz extracelular de fibroblastos na superfície da liga Ti-30Ta com nanotubos após 72 horas de cultura celular quando comparada ao grupo controle. Os resultados obtidos indicam que a formação de nanotubos na liga Ti-30Ta tem o potencial para fornecer uma interface de sucesso para implantes dentários.

PALAVRAS-CHAVE: Ti-30Ta. Oxidação anódica. Nanotubos. Cultura Celular. Fibroblasto.

CAPELLATO, P. **Characterization of Ti-30Ta alloy surface after nanotubes growth.** 2012. 89f. Thesis (Doctorate in Mechanical Engineering) - Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2012.

ABSTRACT

In the last years, titanium and their alloys have been used in dental applications due their excellent properties such as corrosion resistance and biocompatibility. However, these materials are considered bioinerts and due to their poor physiological integration that may result in fibrous encapsulation and further biomaterial rejection. Ti-30Ta alloys, for use in biomedical applications are the subject of this research. The aim is to discover optimal alloy proportions for tissue-like mechanical properties and improved biocompatibility. Of the alloys tested, 30% Ta with Ti exhibits favorable properties including a low elastic modulus, improved strain-resistance and increased elongation to failure. Recent studies have identified strong correlations between anodized metals and the production of highly biomimetic nanoscale topographies. These surfaces provide an interface of enhanced biocompatibility that exhibits a high degree of oxidation and surface energy. In this study, the mechanical substrate and topographical surface properties of anodized Ti-30Ta alloy were investigated using scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive spectroscopy (EDS) and contact angle measurement. The anodization process was performed in an electrolyte solution containing HF (48%) and H₂SO₄ (98%) in the volumetric ratios 1:9 with the addition of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) at 15V, 25V and 35V for 20 and 40 min, producing a nanotube architecture when anodized at 35V for 40 min. Human dermal fibroblasts (HDF, neonatal) were utilized to evaluate the biocompatibility of Ti-30Ta nanotubes after 24 and 72 hours of culture. Cellular adhesion, proliferation, viability, cytoskeletal organization and morphology were investigated using fluorescence microscope imaging, biochemical assay and SEM imaging respectively. The results presented identify altered material properties and improved cellular interaction on Ti-30Ta nanotubes as compared to the control substrates.

Key Words: Ti-30Ta Alloys. Anodization. Ti-30Ta Nanotubes. Human Dermal Fibroblasts.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática do processo de osseointegração	16
FIGURA 2 – Implante dentário	17
FIGURA 3 – Requisitos de um biomaterial	17
FIGURA 4 – Representação esquemática dos mecanismos pelos quais nanosuperfícies podem ser superiores a superfícies convencionais	22
FIGURA 5 – Representação esquemática de anodização eletroquímico	23
FIGURA 6 – Morfologias após anodização	24
FIGURA 7 – Imagens de MEV-FEG de Ta CP após anodização em eletrólito composto por $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HF}$	27
FIGURA 8 – Imagens de MEV-FEG das camadas de óxido formadas na liga Ti-13Ta (a,b); Ti-25Ta (c,d); Ti-50Ta (e-g) e Ti-80Ta (h).....	28
FIGURA 9 – Imagens de MEV-FEG de nanotubos de Ta_2O_5 (Barton et al., 2009).....	29
FIGURA 10 – Imagens de MEV-FEG de nanotubos de Ta_2O_5 (El-Sayed e Birrs,2010)....	30
FIGURA 11– Imagens de MEV-FEG da liga Ti-35Ta após anodização em eletrólito composto por cloreto -perclorato.....	31
FIGURA 12 – Gráfico comprimento e tensão de anodização	32
FIGURA 13 – Gráfico diâmetro, espessura do filme e tempo de anodização.....	34
FIGURA 14 – Imagens de células fibroblásticas coradas com DAPI.....	37
FIGURA 15 – Cobertura e contagem de células fibroblásticas.....	38
FIGURA 16 – MTT teste em titânio e nanotubos de titânio	39
FIGURA 17 – Imagens de células fibroblásticas coradas com F-actin.....	40
FIGURA 18 – Morfologia de células fibroblásticas.....	41
FIGURA 19 – Fluxograma da metodologia (1).....	43
FIGURA 20 – Obtenção da liga Ti-30Ta	44
FIGURA 21 – Forno tubular	45
FIGURA 22 – Prensa rotativa	46
FIGURA 23 – Discos da liga Ti-30Ta.....	46
FIGURA 24 – Montagem empregada na anodização das amostras de Ti-30Ta	48
FIGURA 25 - Forno tipo mufla utilizado para calcinação	48

FIGURA 26 – Microscópio eletrônico de varredura	49
FIGURA 27 – Goniômetro	50
FIGURA 28 – Fluxograma da metodologia (2).....	51
FIGURA 29 – Fluxo laminar e poços de cultura de células	53
FIGURA 30 – MEV-FEG da liga Ti-30Ta 15V-20 min	57
FIGURA 31 – MEV-FEG da liga Ti-30Ta 15V-40 min	58
FIGURA 32 – MEV-FEG da liga Ti-30Ta 25V-20 min	60
FIGURA 33 – MEV-FEG da liga Ti-30Ta 25V-40 min	61
FIGURA 34 – MEV-FEG da liga Ti-30Ta 35V-20 min	62
FIGURA 35 – MEV-FEG da liga Ti-30Ta 35V-40 min	63
FIGURA 36 – MEV-FEG de nanotubos de Ti-30Ta-vista de topo.....	64
FIGURA 37 – MEV-FEG de nanotubos de Ti-30Ta-vista lateral	65
FIGURA 38 – Gráfico do ângulo de contato.....	66
FIGURA 39 – Adesão e proliferação -calcein –AM- 24 horas-grupo controle	69
FIGURA 40 – Adesão e proliferação -calcein –AM- 24 horas -nanotubos	69
FIGURA 41 – Adesão e proliferação -calcein –AM- 72 horas-grupo controle	70
FIGURA 42 – Adesão e proliferação -calcein –AM- 72 horas -nanotubos	70
FIGURA 43 – Gráfico da % de cobertura celular	72
FIGURA 44 – Teste MTT	73
FIGURA 45 – Organização citoesquelética - 24 horas-grupo controle	74
FIGURA 46 – Organização citoesquelética – 24 horas- nanotubos.....	74
FIGURA 47 – Organização citoesquelética – 72 horas-grupo controle	75
FIGURA 48 – Organização citoesquelética – 72 horas- nanotubos.....	75
FIGURA 49 – Morfologia celular - 24 horas-grupo controle	77
FIGURA 50 – Morfologia celular - 24 horas-nanotubos	78
FIGURA 51 – Morfologia celular - 72 horas-grupo controle	79
FIGURA 52 – Morfologia celular - 72 horas-nanotubos	80

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Módulo de elasticidade.....	19
QUADRO 2 – Crescimento de nanotubos em Ta CP.....	35
QUADRO 3 – Crescimento de nanotubos na liga Ti-xTa.....	36
QUADRO 4 – Investigação celular	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros de anodização.....	47
TABELA 2 – Ângulo de contato	67
TABELA 3– Porcentagem de células fibroblásticas	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.2	Objetivo	20
1.3	Estrutura da tese.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	Considerações gerais	21
2.2	Oxidação anódica.....	22
2.2.1	Parâmetros de anodização	26
2.2.1.1	Eletrólito	26
2.2.1.2	Tensão e tempo.....	31
2.2.2	Calcinação de nanotubos.....	33
2.3	Avaliação celular.....	36
2.3.1	Adesão, proliferação e viabilidade	36
2.3.2	Citoesqueleto celular	39
2.3.3	Morfologia celular	40
3	MATERIAIS E METODOS	43
3.1	Preparo da liga e obtenção das amostras	44
3.2	Oxidação anódica da liga Ti-30Ta	47
3.3	Caracterização da superfície	49
3.3.1	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) e microsonda (EDS)	49
3.3.2	Medições de ângulo de contato	50
3.4	Cultura celular e avaliação biológica	51
3.4.1	Cultura celular	52
3.4.2	Avaliação celular.....	53
3.4.2.1	Adesão, proliferação e viabilidade celular de célula HDF em nanotubos	53
3.4.2.2	Organização citoesquelética de célula HDF em nanotubos	54
3.4.2.3	Morfologia celular de HDF em nanotubos	55
3.5	Análise estatística.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Caracterização de superfície após oxidação anódica	56
4.1.1	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) e microsonda (EDS)	56
4.1.2	Medida do ângulo de contato.....	65
4.2	Avaliação celular.....	68
4.2.1	Adesão, proliferação e viabilidade celular	68
4.2.2	Organização citoesquelética	73
4.2.3	Morfologia celular	76
5	CONCLUSÃO.....	81
6	Sugestão para trabalho futuro.....	82
	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	83

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a literatura, biomaterial pode ser definido como todo material de origem natural ou sintética, utilizado por tempo indeterminado na substituição total, parcial ou ainda na reparação de tecidos vivos danificados, para reparar a estrutura biológica perdida ou doente, buscando restabelecer a forma e a função (GEETHA et al., 2009).

Materiais para aplicações biomédicas podem ser fabricados a partir de uma grande variedade de biomateriais, incluindo metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. Biomateriais metálicos podem ser usados em diversas aplicações clínicas com o intuito de reforçar a estrutura ou restaurar a função de tecidos duros, sendo usados como próteses de joelho e quadril, cirurgias de reconstrução facial e implantes dentários (OH et al., 2005).

Elementos dentais têm sido substituídos desde antes da era cristã em função da necessidade funcional ou estética o que levou a procura de materiais compatíveis para esta função. Relatos egípcios e da era pré-colombiana descrevem o uso de marfim, metais e dentes retirados de cadáveres que eram utilizados esteticamente para substituir dentes (PHILLIPS, 1991). No ramo de implantes dentários as pesquisas de Branemark (1983) desenvolveram o conceito de osseointegração quando investigavam a cicatrização óssea em coelhos. Neste estudo uma câmera óptica de titânio foi inserida no osso para observar o processo de osteogênese (formação óssea) em coelhos, após alguns meses quando da retirada desta câmera observou-se que a mesma estava fortemente fixada ao osso e o tecido ao redor não mostrava sinais de inflamação. A esse fenômeno deu-se o nome de osseointegração definida como a união estável e funcional entre o osso e a superfície do material implantado com a ausência de tecido fibroso na interface osso- implante (BRANEMARK, 1983).

Na Figura 1 podem ser observadas as etapas do processo de osseointegração de um implante odontológico de Ti CP descrito histologicamente por Branemark (1983). O implante dentário não apresenta exatamente o mesmo formato do espaço no osso perfurado. A rosca ou morfologia do implante tem a função mecânica de imobilizar o mesmo no osso, imediatamente após a sua colocação e durante o estágio inicial de cicatrização. Um hematoma é originado no sítio receptor pelo trauma da ação mecânica e térmica da implantação. Este hematoma (2) ficará entre o implante (1) e o tecido ósseo injuriado (3). A etapa de cicatrização (Etapa 1) irá ocorrer até 6 meses após a implantação metálica quando então o hematoma regenera-se sendo gradualmente transformado em um novo tecido ósseo (Etapa 2). Devido às atividades osteoblásticas e osteoclásticas a região do tecido ósseo injuriado também é cicatrizada pelos processos biológicos de remineralização, desmineralização e

revascularização (6). Pode ser observado o processo de cicatrização concluído (Etapa 3) com o implante em contato direto com o novo tecido ósseo formado sem a presença de uma camada fibrosa. Na Figura 2 pode observado exemplo de um implante dentário e sua relação com o dente natural.

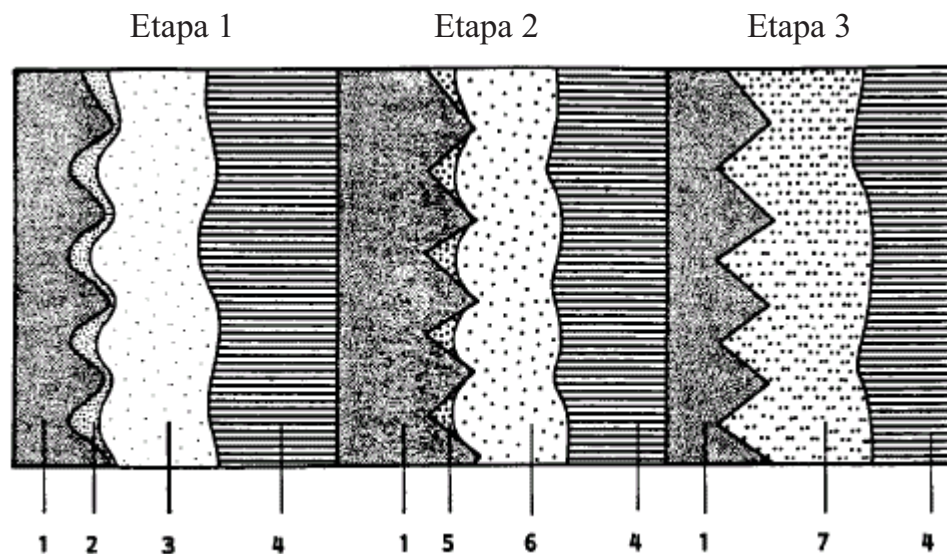


Figura 1 – Representação esquemática do processo de osseointegração de um implante odontológico de Ti CP: (1) Superfície de TiO_2 do implante (2) Hematoma, (3) Tecido ósseo danificado, (4) Tecido ósseo saudável, (5) Hematoma transformado em novo tecido ósseo, (6) Tecido ósseo danificado cicatrizado pela desmineralização e remineralização, (7) Novo tecido ósseo saudável (adaptado de BRANEMARK (1983)).

O biomaterial para uso intra-ósseo deverá apresentar biocompatibilidade e propriedades mecânicas similares ao osso humano (ZHOU; NIINOMI, 2009). Um modelo que envolve os requisitos essenciais para um biomaterial foi proposto por Chu et al., (2002) observando as características biológicas, dos materiais e de fabricação para um implante (Figura 3).

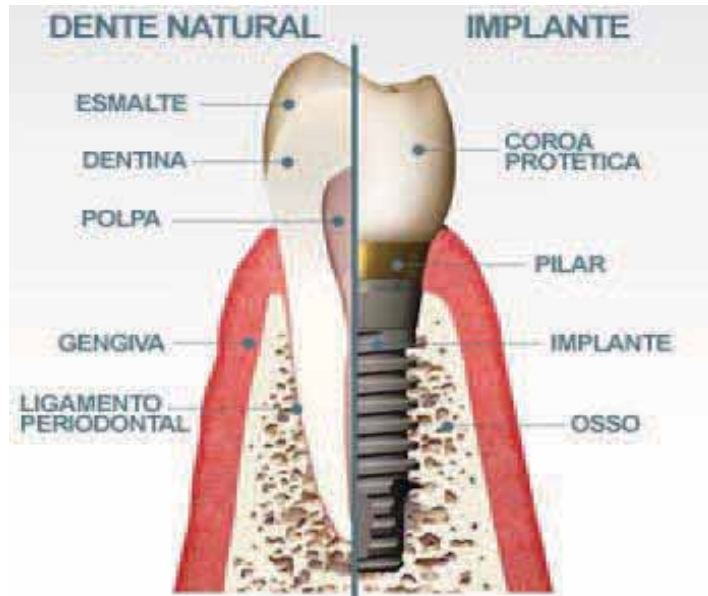


Figura 2 – Representação esquemática de um implante dentário (Adaptado de (<http://implantesdentales-co.blogspot.com>))



Figura 3 - Requisitos essenciais para um biomaterial

O biomaterial ideal para implantes ósseos deve apresentar propriedades mecânicas comparáveis ao do tecido natural onde ele é inserido para que não ocorra tensão adicional ao tecido circundante (KURELLA; DAHOTRE, 2005). O tecido ósseo humano apresenta propriedades mecânicas como alta resistência à fadiga, ductilidade, baixo módulo de elasticidade, resistência ao desgaste e à corrosão (BANNON; MILD, 1983; GALANTE et al., 1991; KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003; OH et al., 2005; HABIBOVIC et al., 2006; NIINOMI, 2008).

Pesquisas têm sido realizadas com o Ti CP e titânio e suas ligas com o objetivo de se alcançar o biomaterial ideal para uso em implante dentário, sendo a liga Ti6Al4V a mais empregada. No entanto, a baixa resistência mecânica do titânio CP e os efeitos citotóxicos atribuídos a utilização da liga Ti6Al4V como, por exemplo, doença de Alzheimer (BALAZAC et al., 2007; BOZIC et al., 2010; BOZKUS; GERMEC-CAKAN; ARUN, 2011; ELLINGSEN; THOMSEN; LYNGSTADAAS, 2006; LIU;CHU; DING, 2004; MJOBERG et al., 1997; WANG,1996; ZAFFE; BERTOLDI; CONSOLO, 2004) tem levado ao desenvolvimento de metais com a adição de elementos de ligas não-tóxicos como, por exemplo, Ta, Zr, Nb, Hf, Mo e Sn (EISENBARTH et al., 2004; GHERARDI, 1984; JIANTING; RANUCCI; LIU;CHU; DING, 2004; MARECI et al., 2009; MIYAZAKI, 2000,2001, 2002; NIINOMI, 2002; TAKAO, 2006; VARIOLA et al., 2009 ; ZHOU; NIINOMI, 2004 b, 2008, 2009; YAO et al., 2007; WEI et al., 2007).

Pesquisas recentes têm investigado o sistema binário Ti-Ta para descobrir a proporção ideal de acréscimo de tântalo para obter melhores propriedades mecânicas e de biocompatibilidade. Das ligas testadas, Ti com 30% de Ta apresenta as melhores condições para uso em implantes dentários por apresentar propriedades mecânicas mais próximas à do tecido natural, menor módulo de elasticidade e biocompatibilidade com o corpo humano (DOBROMYSLOV et al., 2009;EISENBARTH et al., 2004; GIL et al., 2011; MARECI et al., 2009; ZHOU; NIINOMI, 2004 b, 2005, 2008, 2009).

No Quadro 1 pode ser observado o módulo de elasticidade do Ti CP, da liga Ti6Al4V, Ti-30Ta e do osso humano (ZHOU; NIINOMI, 2004 b, 2009).

Quadro 1- Módulo de elasticidade (Adaptado de Zhou e Niinomi (2004 b, 2009)

Material	Módulo de elasticidade (GPa)
TiCP	103
Ti6Al4V	124
Ti-30Ta	69
Osso humano	10-30

Além de estabelecer propriedades físicas compatíveis, a interface favorável implante/tecido é também determinante para o sucesso em longo prazo de dispositivos ósseos implantáveis. Modificações na morfologia de superfície de um biomaterial que imitem a arquitetura do tecido natural tem demonstrado melhorar as interações celulares e promover a formação de tecido saudável (SHIMOJO et al., 2007; ALLAM; FENG; GRIMES, 2008). Diferentes técnicas de modificação de superfície para biomateriais metálicos foram propostas nos últimos anos buscando uma melhor resposta biológica após a sua implantação. Estes tratamentos de superfície podem ser classificados em métodos mecânicos, físicos e químicos de acordo com o mecanismo de formação da camada superficial do material (LIU et al., 2008). Abordagens de modificação de superfície incluem técnicas como anodização (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008; WANG, 1996), tratamento alcalino e térmico (MIYAZAKI et al., 2002), implantação iônica (FUKUMOTO et al., 1999; LEI et al., 2001), SFB (KIM et al., 2002) e plasma spray (LIU; CHU; DING, 2004; RIEDEL; WILLIAMS; POPAT, 2011; ZHU et al., 2011). Modificação bioquímica de superfície pode ser definida como uma técnica que promove reações químicas na interface metal /solução.

Estudos com diferentes tipos de células investigaram a resposta celular em superfícies nanoestruturadas encontrando uma resposta favorável que altera a adesão celular de maneira direta e indireta (CHOE, 2011; POPAT et al., 2007 a, 2007 b; SMITH et al., 2010, 2011).

Além disso, a superfície do metal anodizado com morfologia tubular apresenta um maior grau de oxidação e de energia de superfície, bem como melhora considerável da biocompatibilidade (BALLA et al., 2010). Estudos anteriores mostraram evidências que suportam o uso de nanotubos de titânio produzidos pela anodização do mesmo, para

dispositivos implantáveis que interagem com ambos os tecidos, duros e moles (CHOE, 2011; DAS; BOSE; BANDYOPADHYAY, 2009; OH et al., 2006 a; POPAT et al., 2007b; SMITH et al., 2010,1022; WANG et al., 2011).

1.2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é a investigação do processo de anodização da liga Ti-30Ta para a obtenção de nanotubos, e caracterizá-la quanto às propriedades físicas e biológicas a partir da realização de estudo *in vitro* com cultura de célula fibroblásticas, para posterior aplicação na superfície de implantes dentários.

1.3 ESTRUTURA DA TESE

Esta tese foi dividida em cinco capítulos e referências bibliográficas, e seu conteúdo apresenta-se distribuído da seguinte forma:

Capítulo 1, Introdução: expõe aspectos gerais sobre a tese, proposta do trabalho, objetivos e a estrutura da tese.

Capítulo 2, Revisão da Literatura: considerações gerais sobre implantes de titânio e suas ligas, osseointegração e tratamentos superficiais.

Capítulo 3, Materiais e Métodos: descrição dos métodos utilizados no preparo das amostras, processo de anodização da liga, caracterização física das superfícies após anodização e avaliação celular.

Capítulo 4, Resultados e Discussão: apresentação dos resultados alcançados nos experimentos realizados no trabalho e suas respectivas análises, em confronto com outros autores e trabalhos revisados da literatura.

Capítulo 5, Conclusões: são expostas as conclusões obtidas a partir da avaliação criteriosa dos resultados encontrados neste estudo.

Capítulo 6, Sugestões para trabalhos futuros: expõe sugestões para a continuidade da pesquisa pertinentes ao tema.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Titânio e suas ligas são biomateriais metálicos empregados em aplicações biomédicas, na fabricação de implantes dentários, por exemplo, devido as suas excelentes propriedades mecânicas e resistência à corrosão. Para melhorar a osseointegração desses materiais, diversas técnicas de modificação de superfície podem ser empregados métodos mecânicos, físicos e químicos de acordo com o mecanismo de formação da camada superficial do material (LIU et al., 2008). Abordagens de modificação de superfície para alterar a superfície do biomaterial em diferentes profundidades incluem técnicas como anodização (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008; WANG et al., 2011), tratamento alcalino e térmico (MIYAZAKI et al., 2002) implantação iônica (FUKUMOTO et al., 1999; LEI et al., 2001), tratamento biomimético (BARRERE et al., 2003) e plasma spray (LIU; CHU; DING, 2004; RIEDEL; WILLIAMS; POPAT, 2011; ZHU et al., 2011).

Os diferentes tipos de rugosidade podem ser classificados de acordo com o tamanho da irregularidade na superfície do material. Macrorugosidades podem ser caracterizadas como irregularidades visíveis pelo olho humano, com tamanho mínimo de 100 μ m. A rugosidade de superfície em microescala pode ser definida por irregularidades de 1 a 100 μ m, em submicrometro com tamanhos de 100 nm a 1 μ m e nanorugosidades por irregularidades menores que 100nm (ZHANG; WEBSTER, 2009). Cada tipo de rugosidade apresenta uma influência específica na adesividade celular (BACAKOVA et al., 2011).

Na Figura 4 é possível observar uma ilustração esquemática do mecanismo a partir do qual nanomateriais podem ser superiores aos materiais convencionais quando se considera a regeneração óssea. As superfícies de nanomateriais imitam a superfície dos ossos naturais promovendo assim uma maior quantidade de adsorção de proteínas e estimulando uma maior formação óssea do que os materiais convencionais (ZHANG; WEBSTER, 2009).

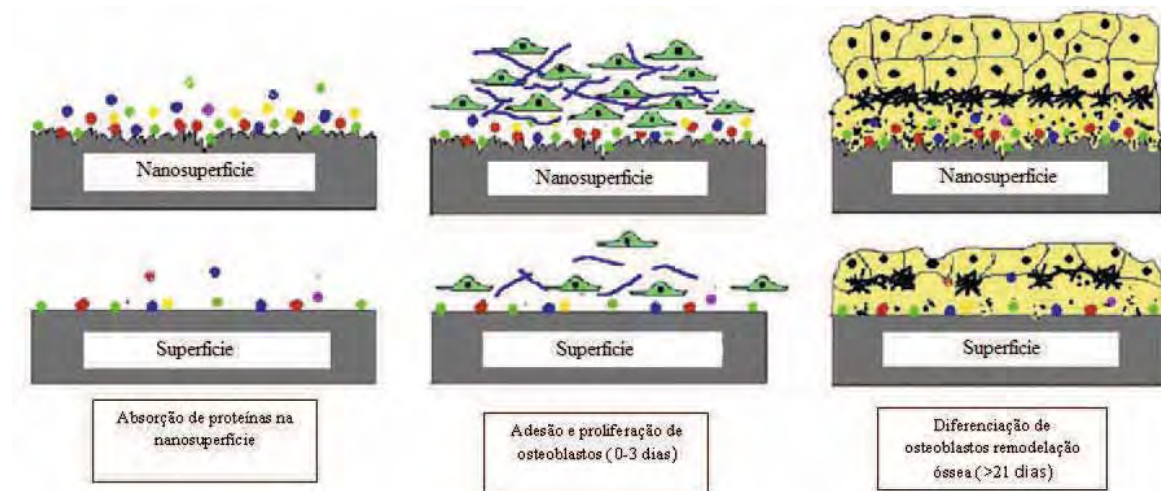


Figura 4- Representação esquemática dos mecanismos pelos quais nanosuperfícies podem ser superiores a superfícies convencionais para o processo de regeneração óssea (adaptado de ZHANG et al., 2009)

A formação de camadas de óxidos nanoestruturadas na superfície de metais do tipo válvula (metais que formam uma camada passiva resistente a corrosão) como tântalo, titânio CP e suas ligas, empregando oxidação anódica têm atraído grande interesse. Essa técnica modifica a morfologia desses materiais a partir da formação de nanotubos que alteram a reposta biológica do tecido ósseo ao redor do material implantado. Acredita-se que a arquitetura dos nanotubos, similar a do osso cortical, seja um fator diferencial na melhoria da integração óssea (POPAT et al., 2007; SMITH et al., 2010, 2011). Com isso, a presença de nanotubos de TiO_2 na superfície do titânio CP promoverá um aumento na formação mineral (OH; JIN, 2006), maior adesão de osteoblastos (OH et al., 2006) e significativa osseointegração in vivo (BJURSTEN et al., 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* (LIU et al., 2008; VETRONE et al., 2009; WU et al., 2009) mostram que a resposta celular reage positivamente a nanomorfologia, pois exibem mudanças na morfologia celular, orientação celular, organização citoesquelética, proliferação e expressão genética.

2.2. OXIDAÇÃO ANÓDICA

O processo de anodização consiste na criação de um filme óxido em um metal por meio de imersão em um meio eletrolítico. Na célula eletroquímica, o metal que se deseja

anodizar é ligado ao pólo positivo de uma fonte de corrente contínua transformando-se no anodo da cuba eletrolítica. O catodo é ligado ao pólo negativo e ele pode ser uma placa ou barra, de platina, grafite ou qualquer outro metal condutor que não reaja com o banho de anodização. O anodo será o eletrodo para onde se dirigem os ânions e o catodo o eletrodo para onde vão os cátions. Quando o circuito é fechado uma reação de oxidação ocorre ($M \rightarrow M^{n+} + ne^-$). Na Figura 5 é possível observar a representação esquemática do processo de anodização eletroquímico (ROY; BERGER; SHMUKI, 2011).

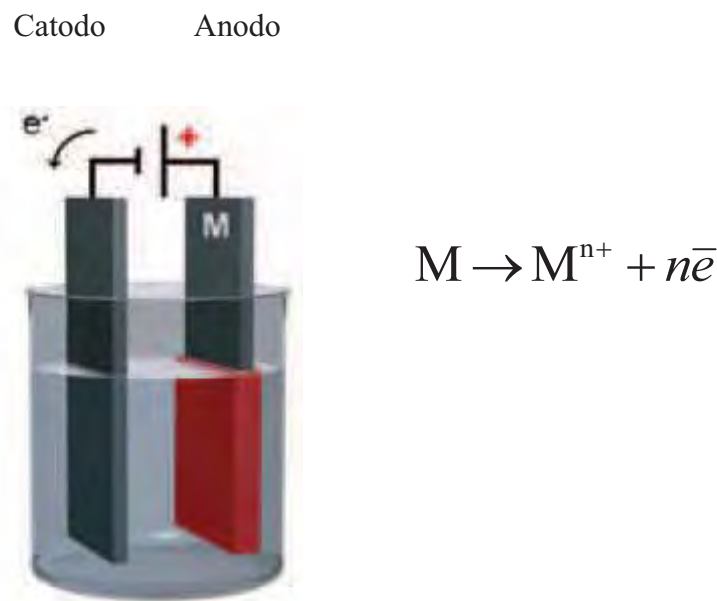


Figura 5 – Representação esquemática do processo de anodização eletroquímico

Dependendo do eletrólito e dos parâmetros de anodização, três possibilidades de reações podem existir (Figura 6):

- I) os íons M^{n+} no eletrólito, isto é, o metal é continuamente dissolvido (corrosão);
- II) os íons M^{n+} formados reagem com O^{2-} (fornecido pela água presente no eletrólito) e formam uma camada de óxido compacta (MO), se MO não é solúvel no eletrólito;
- III) sob algumas condições eletroquímicas será estabelecida uma competição entre a solvatação e formação do óxido, levando à formação de uma camada de óxido (MO) porosa. Sob condições experimentais mais específicas ocorrerá a auto-organização dos poros durante o crescimento;

- IV) Além disso, poderá também ocorrer o crescimento rápido desordenado de nanotubos ou ainda a formação de camadas auto organizadas de mesoporos.

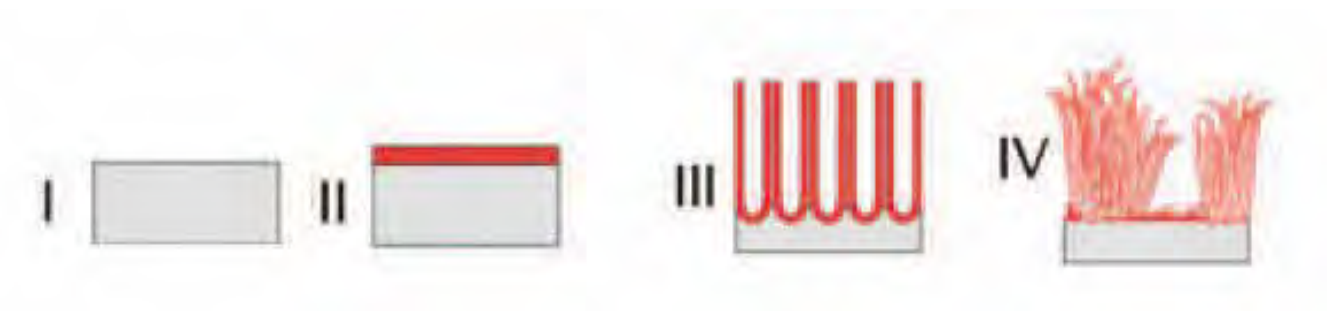


Figura 6 – Possíveis morfologias após anodização: (I) metal elétropolido; (II) formação de camada de óxido compacta; (III) formação de nanotubos ou nanoporos auto-organizados; (IV) nanotubos desordenados; (Adaptado de ROY; BERGER; SHMUKI, 2011)

A obtenção de estrutura tubular no Ti CP tem sido intensamente investigada devido a diversas áreas de aplicação deste material como: fotocatalise, célula solar, área biomédica, cerâmicas, catálise, etc. O titânio e outros metais são conhecidos como metais válvula há mais de 50 anos por serem capazes de crescer uma camada de óxido compacta resistiva em sua superfície a partir do processo de anodização, com considerável espessura, em eletrólito aquoso (MACAK et al., 2007).

Existem diversas técnicas para produzir nanotubos de TiO_2 por anodização. Os eletrólitos são formados tipicamente por soluções contendo íons fluoreto como, por exemplo, ácido fluorídrico (HF). O titânio forma uma camada passiva estável de TiO_2 em sua superfície que o protege contra a corrosão e que quando danificada reconstrói-se rapidamente em contato com ar ou água. Esta reação resultará em TiO_2 bem como gás hidrogênio de acordo com a seguinte reação exposta na equação(1) (EL-SAYED; BIRRS, 2009):



Quando a superfície do Ti CP entra em contato com uma solução aquosa contendo fluoreto o mecanismo de formação dos nanotubos ocorre de acordo com a equação (2) (EL-SAYED; BIRRS, 2009):



Neste processo, uma camada intermediária $[\text{TiF}_6]^{2-}$ é formada na superfície do titânio na solução contendo fluoreto.

O processo de anodização do tântalo CP é similar ao do titânio CP. Inicialmente uma camada compacta de óxido é formada a partir da hidrólise do tântalo exposta na equação (3) (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008):



Esta reação leva a uma drástica diminuição na corrente de anodização devido à baixa condutividade elétrica. Em seguida, essa camada de óxido de tântalo (Ta_2O_5) começa a dissolver originando poros, porém essa dissolução não é uniforme. Assim, a formação de um filme de óxido compacto é simultânea a sua não dissolução e essa competição entre o crescimento e a dissolução do óxido produzirá um filme de óxido poroso contínuo. Esta situação é válida quando o tântalo é anodizado em eletrólito formado por ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido fluorídrico (HF). O íon fluoreto é o único capaz de atacar quimicamente o óxido de tântalo, fornecendo durante a anodização a taxa de dissolução necessária em locais específicos onde ocorre filme poroso de óxido conforme exposto na equação (4) (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008):



Então, o campo elétrico aplicado garante que um filme compacto de Ta_2O_5 seja continuamente formado na base do poro através da equação (4) (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008; EL-SAYED; BIRRS, 2009 ; JHA; HAHN; SHMUKI, 2010).

Para um melhor entendimento o processo de crescimento de nanotubos pode ser dividido em três etapas principais: formação de uma camada compacta de Ta_2O_5 , formação de uma camada de poros uniformemente distribuídos e formação de nanotubos.

Os parâmetros da solução eletrolítica como concentração de ácido fluorídrico (HF), pH e quantidade de água assim como as condições eletroquímicas, como tensão e tempo, determinam a morfologia e a estrutura da camada porosa/ tubular durante o processo de anodização do titânio e outros metais de transição (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008; JHA; HAHN; SHMUKI, 2010; MACAK; SIRODNA; SCHMUKI, 2005; MACAK et al., 2007; ROY; BERGER; SHMUKI, 2011).

2.2.1 Parâmetros que influenciam no processo de anodização

O processo de crescimento de nanotubos por meio da anodização pode ser influenciado por diversos parâmetros do processo como o tipo de eletrólito, tensão e tempo de exposição do metal.

2.2.1.1 Eletrólito

Diversos eletrólitos têm sido investigados para o crescimento de nanotubos em titânio CP (MACAK et al., 2007; REGONINI et al., 2010; ROY; BERGER; SHMUKI, 2011; VARIOLA et al., 2009; VETRONE et al., 2009), tântalo CP (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008; EL-SAYED; BIRRS, 2009, 2010; SIEBER; KANNAN; SGHMUKI, 2005; WEI; MACAK; SCHMUKI, 2008; BARTON et al., 2009; RUCKH et al., 2009; FENG et al., 2010) e ligas de titânio-tântalo (TSUCHIYA et al., 2009; JHA; HAHN; SHMUKI, 2009).

A primeira geração de fabricação de nanotubos de TiO_2 empregava eletrólitos a base de ácido fluorídrico (HF) resultando em camadas de óxidos com uma espessura não superior a 500-600 nm. Eletrólitos tamponados neutros contendo fluoreto de sódio (NaF) ou fluoreto de amônio (NH_4F) foram empregados na segunda geração em substituição ao ácido fluorídrico (HF) sendo possível o crescimento de nanotubos de TiO_2 com espessuras superiores a 2 μm . Na terceira geração, nanotubos foram fabricados em eletrólitos contendo pouca ou quase nenhuma água. Neste tipo de eletrólitos com glicerol foi possível crescer nanotubos com paredes retas e comprimento de mais de 7 μm , enquanto eletrólitos contendo pequenas quantidades de ácido acético (CH_3COOH) produziu tubos de pequeno diâmetro (MACAK et al., 2007).

A anodização de tântalo em solução aquosa formada por $\text{HF} + \text{H}_2\text{SO}_4$ (razão 1:9) contendo baixas concentrações de etileno glicol (EG) ou dimetil sulfóxido (DMSO) produziu nanotubos ordenados de tântalo. Esses nanotubos foram depositados em regiões e com paredes de espessuras variáveis, devido à presença de aditivos orgânicos, conforme observado na Figura 7.

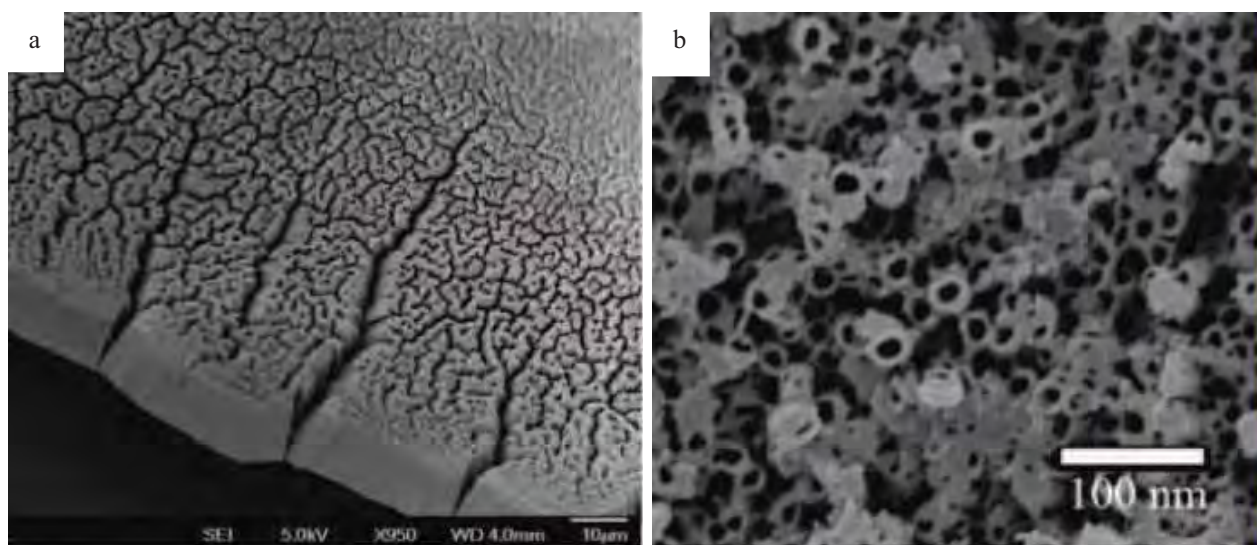


Figura 7- Imagens MEV-FEG do Ta CP anodizado em eletrólito $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HF}$ sob tensão de 20V durante 20 min. a) vista lateral e b) vista de topo em maior aumento (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008)

Tsuchiya et al. (2009) investigou a oxidação anódica de ligas do sistema binário Ti-Ta para quatro diferentes composições: Ti-13Ta, Ti-25Ta, Ti-50Ta e Ti-80Ta. O experimento foi realizado sob 20V de tensão, durante 1200 s em eletrólito contendo ácido fluorídrico (HF), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e água deionizada. Nestas condições foram produzidos nanotubos de dois diferentes comprimentos devido a composição das ligas serem bifásicas (α e β). A anodização de ligas de duas fases pode resultar em superfícies não homogêneas, devido à dissolução seletiva da fase menos estável e/ou diferentes taxas de reações nas fases da liga. As morfologias das camadas de óxido das ligas Ti-13Ta e Ti-25Ta refletem microestruturas do tipo Widmanstätten. Conforme observado nas imagens na Figura 8 b e d estruturas nanotubulares foram formadas na superfície das ligas, mas em alguns locais uma estrutura desordenada foi observada. Por outro lado para a liga Ti-50Ta (Figura 8 e) a região formada apresenta regiões claras e escuras, com formação de nanoporos e nanotubos, respectivamente (Figura 8 f-g). Para a liga Ti-80Ta apenas a formação de nanoporos foi observada (Fig. 8 h). Os autores concluíram, a partir da realização desse estudo, que nanotubos auto-organizados podem ser obtidos para a liga Ti-50Ta, no entanto, o comprimento desses nanotubos dependerá fortemente da composição das fases das ligas.

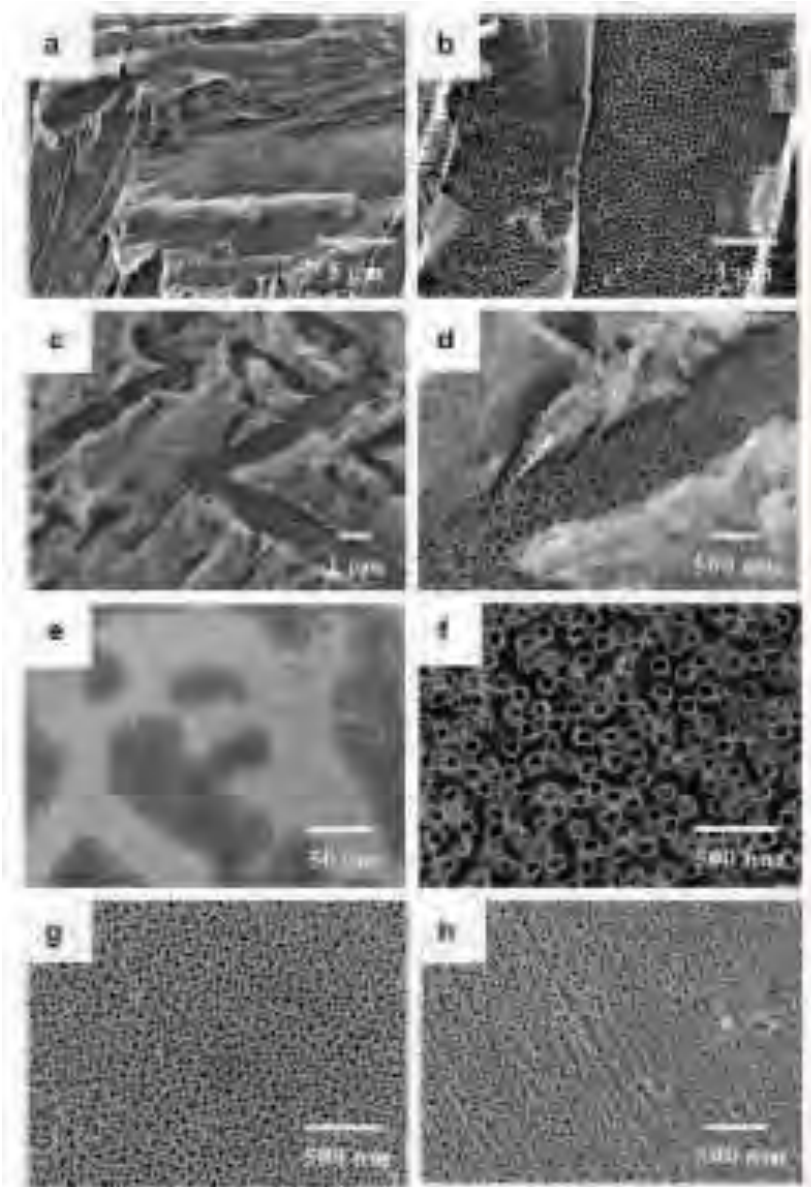


Figura 8- Imagens de MEV-FEG das camadas de óxido formadas na liga (a,b)Ti-13Ta (c,d) Ti-25Ta (e-g) Ti-50Ta (h) Ti-80Ta (adaptado de TSUCHIYA et al., 2009)

Barton et al.(2009) avaliou a formação de nanotubos em tântalo CP de acordo com a proporção de água, ácido fluorídrico e tensão aplicada. Os autores buscaram controlar a morfologia do óxido de tântalo (Ta_2O_5) a partir do ajuste da viscosidade da solução de maneira similar ao preconizado para o titânio CP, utilizando glicerol ou etilenoglicol (solvente não-aquoso) além da adição em pequenas quantidades de íons de flúor. No caso do titânio CP é comum a formação de paredes tubulares lisas, homogêneas e com grande razão entre comprimento e diâmetro quando anodizado em soluções com glicerol e 0,5 % (m/m) de

fluoreto de amônio (NH_4F). Os autores concluíram que a razão $\text{H}_2\text{O}/\text{HF}$ é a chave para controlar o comprimento, diâmetro interno e externo dos nanotubos (Figura 9).

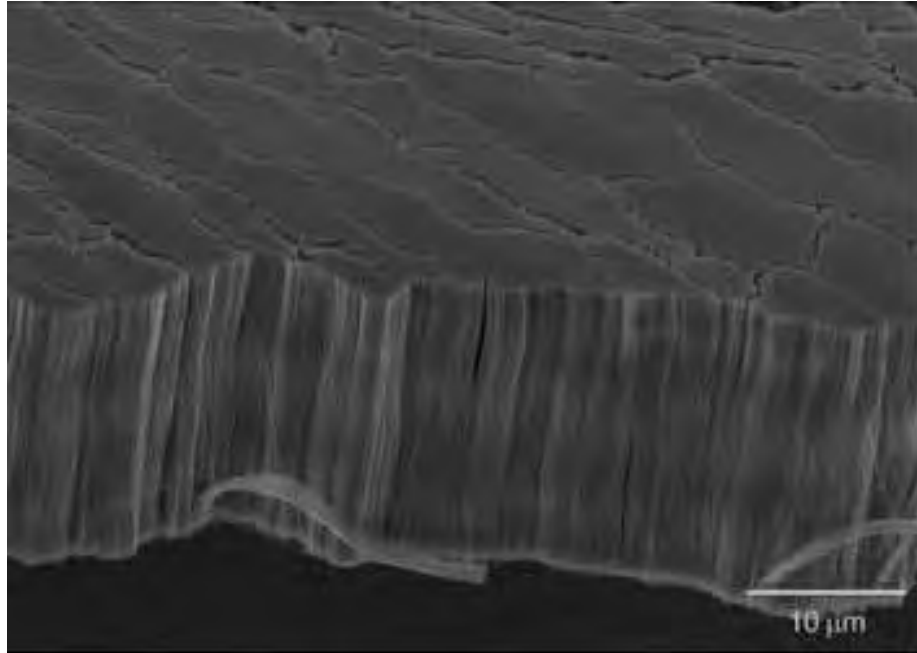


Figura 9 - Imagens de MEV-FEG da camada de nanotubos de Ta_2O_5 (adaptado de BARTON et al., 2009)

El-Sayed e Birrs (2010) investigaram o processo de anodização do tântalo CP em eletrólito contendo $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HF}$ sob tensão de 14,5V, com variação do tempo de 5 s a 3600s. Na Figura 10 podem ser observados nanotubos de Ta_2O_5 formados após um tempo de 90 s. Nesta condição, observou-se a formação de nanotubos de Ta_2O_5 aglomerados em regiões localizadas e distintas de nanotubos de Ta_2O_5 separados por vãos contendo *dimples* de tântalo.

A influência da concentração de ácido fluorídrico (HF) na formação de nanotubos foi investigada por Sieber, Kannan, Scmuki (2005). Quando a concentração de ácido fluorídrico (HF) foi utilizada com valores inferiores a 0,5 % (m/m) apenas poros isolados se formaram, entre 0,5-1 % (m/m) poros não regulares são gerados, acima de 3 % (m/m) apenas resíduos de poros foram encontrados e na concentração de 4% (m/m) nenhuma formação ocorreu. Poros regulares foram encontrados apenas na concentração de 2 % (m/m).

Oh et al. (2005) investigou o processo de anodização do titânio CP em eletrólito aquoso com ácido fluorídrico (HF) sob tensão de 20V durante 30 min. Os autores obtiveram nanotubos de TiO_2 alinhados verticalmente em toda a superfície.

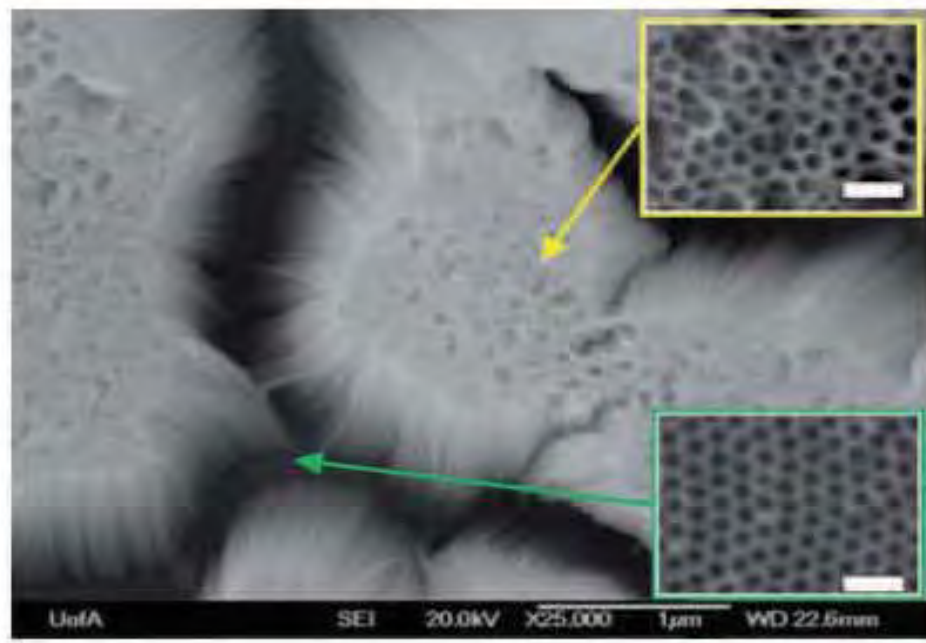


Figura 10- Imagens de MEV-FEG de nanotubos de Ta_2O_5 (adaptado de EL- SAYED ; BIRRS, 2010)

Feng et al. (2010) pesquisou o efeito da adição de maior quantidade de água no eletrólito $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HF}$. A água deionizada foi acrescentada substituindo em 85% a quantidade de HF com o objetivo de diminuir o impacto da reação eletroquímica. Com uma tensão de 15V e tempo de 30 min os autores obtiveram uma estrutura tubular homogênea e nanotubos de 240 nm de comprimento.

De acordo com a literatura, o emprego do eletrólito composto por perclorato - cloreto de sódio para ligas Ti-Ta, levou a formação de uma estrutura tubular, irregular, não homogênea e em apenas pontos isolados com formato de couve-flor (JHA;HAHN;SHMUKI, 2010). Por outro lado, eletrólitos a base de ácido fluorídrico produzem uma estrutura tubular mais organizada, contendo, no entanto, nanotubos de diferentes comprimentos (TSUCHIYA et al., 2009) conforme pode ser observada na Figura 11.



Figura 11- Imagens de MEV-FEG da liga Ti-35Ta após anodização em eletrólito composto por cloreto-perclorato. (a) menor aumento com imagem de flor, (b) imagem de menor aumento dos feixes de nanotubos, (c) imagem de nanotubos em bloco mostrando diversas camadas e d) imagem de maior aumento do bloco de nanotubos mostrando o topo com nanotubos organizados (adaptado de JHA;HAHN;SHMUKI, 2010)

2.2.1.2 Tensão e tempo

A tensão aplicada ao processo de anodização influencia de maneira direta o comprimento dos nanotubos formados. De acordo com estudos realizados por Allam, Feng, Grimes (2008) (Figura 12) a tensão elevada aplicada em eletrólitos orgânicos, Etileno glicol (EG) e Dimetil Sulfóxido (DMSO), leva a formação de nanotubos com maior comprimento e espessura da ordem de 19 μm .

Valores de tensão do processo de anodização entre 30V- 40V proporcionaram maiores diâmetros de nanotubos, no entanto, a proporção água/ácido fluorídrico também são fatores determinantes na organização dos nanotubos (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008; BARTON et al., 2009).

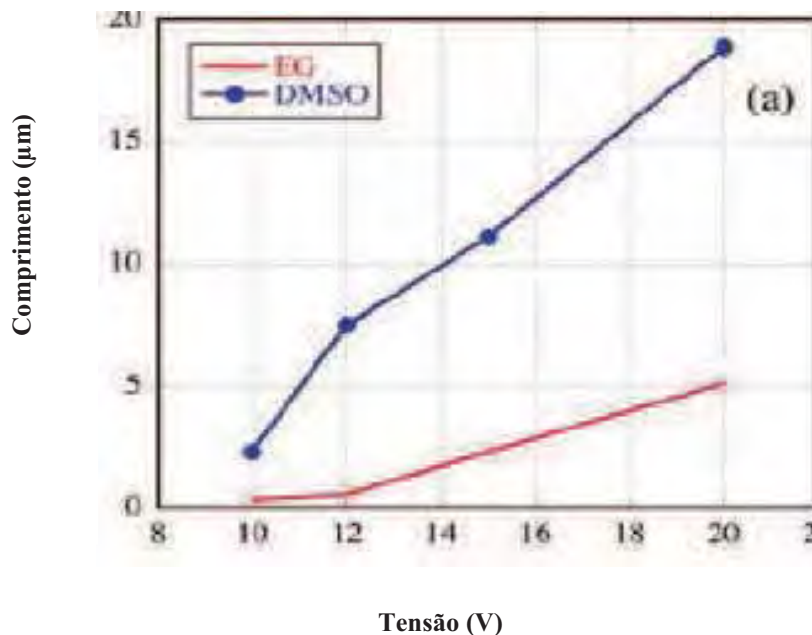


Figura 12 – Gráfico da variação do comprimento do nanotubo em função da tensão de anodização em amostras de Ta CP na presença de etilenoglicol (EG) e dimetil sulfóxido (DMSO) (adaptado de ALLAM; FENG; GRIMES, 2008)

Diversos eletrólitos têm sido investigados para o crescimento de nanotubos em titânio CP. Wei, Macak, Shmuki (2008) investigaram o processo de anodização alterando o eletrólito e a tensão. Foi utilizado eletrólito contendo glicerol e amônia (NH_4F). Nestas condições eles variaram a tensão entre valores de 10 até 50V. Os resultados encontrados mostraram que o diâmetro do poro na camada aumenta no intervalo de 10-20V, sendo que o maior valor foi encontrado para 20V. Para valores de tensão entre 20V e 50V, o diâmetro do poro diminui conforme a tensão aumenta. Estes resultados demonstram a estreita relação entre a tensão e o diâmetro do poro que será formado durante o processo de anodização.

Por outro lado, o tempo empregado no processo de anodização, ou seja, o tempo de permanência no eletrólito com uma dada tensão influenciará o comprimento do nanotubo (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008).

Ruckh et al. (2009) fabricaram nanotubos ordenados em eletrólito contendo H_2SO_4 + HF + DMSO durante 20 min. Neste experimento variou-se a tensão obtendo diferentes comprimentos de nanotubos, sendo para 10 V - 2,3µm, 12V- 7,5 µm e para 15V- 11,1 µm. Demonstrando assim a íntima relação entre a tensão de anodização e o comprimento do nanotubo.

Sieber, Kannan, Schmuki (2005) investigaram a formação de uma camada porosa de tântalo a partir da variação do tempo de anodização. Os autores concluíram que após duas horas de anodização ocorre uma distribuição regular dos poros, enquanto após três horas, poros maiores com morfologia extremamente irregular são formados. O descolamento da camada de óxido correu após 4 horas. Este estudo elucidou a relação existente entre o tempo de anodização e diâmetro dos poros. Na figura 13 (a) é possível observar o diâmetro do poro formado na camada porosa após 1, 2, 3 e 4 horas do metal submetido ao processo de anodização e na Figura 13 (b) pode-se observar a relação entre a espessura do filme poroso e o tempo de anodização.

El- Sayed e Birrs (2009) investigaram a anodização do tântalo em solução formada por H_2SO_4 e HF com aplicação de tensão de 15 V. Neste estudo foi investigado o efeito de tempo de anodização na formação de nanotubos. O autor variou os tempos de anodização (5, 10, 20, 60, 90 e 120 s) sendo que após 20 s os nanotubos se apresentaram verticalmente alinhados, com 60 s eles se tornaram mais longos (2- 2,5 μm) e com 90 s a formação tubular foi obtida, porém os nanotubos parecem estar selados. Os autores concluíram que nestas condições de anodização nanotubos estáveis são formados no tempo acima de 10 s e abaixo de 120 s.

2.2.2 Calcinação de nanotubos

Os nanotubos obtidos por oxidação anódica possuem estrutura amorfa sendo necessária a estabilização da fase por meio da calcinação para a obtenção da estrutura cristalina. As temperaturas de calcinação são variáveis e estão relacionadas com o óxido formado sobre a superfície. Para tântalo e suas ligas, temperaturas de calcinação compreendidas entre 400 °C a 700 °C são empregadas, uma vez que de acordo com a literatura temperaturas superiores a 800°C levam a um colapso estrutural dos nanotubos (BARTON et al., 2009).

A partir do emprego de temperaturas de calcinação de 400°C durante 3 horas é possível a obtenção de estruturas nanotubulares cristalinas em tântalo CP (ALLAM; FENG; GRIMES, 2008). Jha, Hahn, Schmuki (2010) investigaram a nanoestrutura formada após o processo de calcinação na liga Ti-35Ta anodizada em eletrólito $\text{NaCl}_4 + \text{NaCl}$ 50:50 vol% $\text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ sob 40V de tensão por 120 s. Os autores investigaram o processo de calcinação a 700°C durante 3 horas em nanotubos de Ti-35Ta empregando raios X.

Verificaram que os nanotubos apresentam estrutura amorfa após sua formação e estrutura cristalina após a calcinação, sendo presente a fase anatase (TiO_2) e óxido de tântalo (Ta_2O_5).

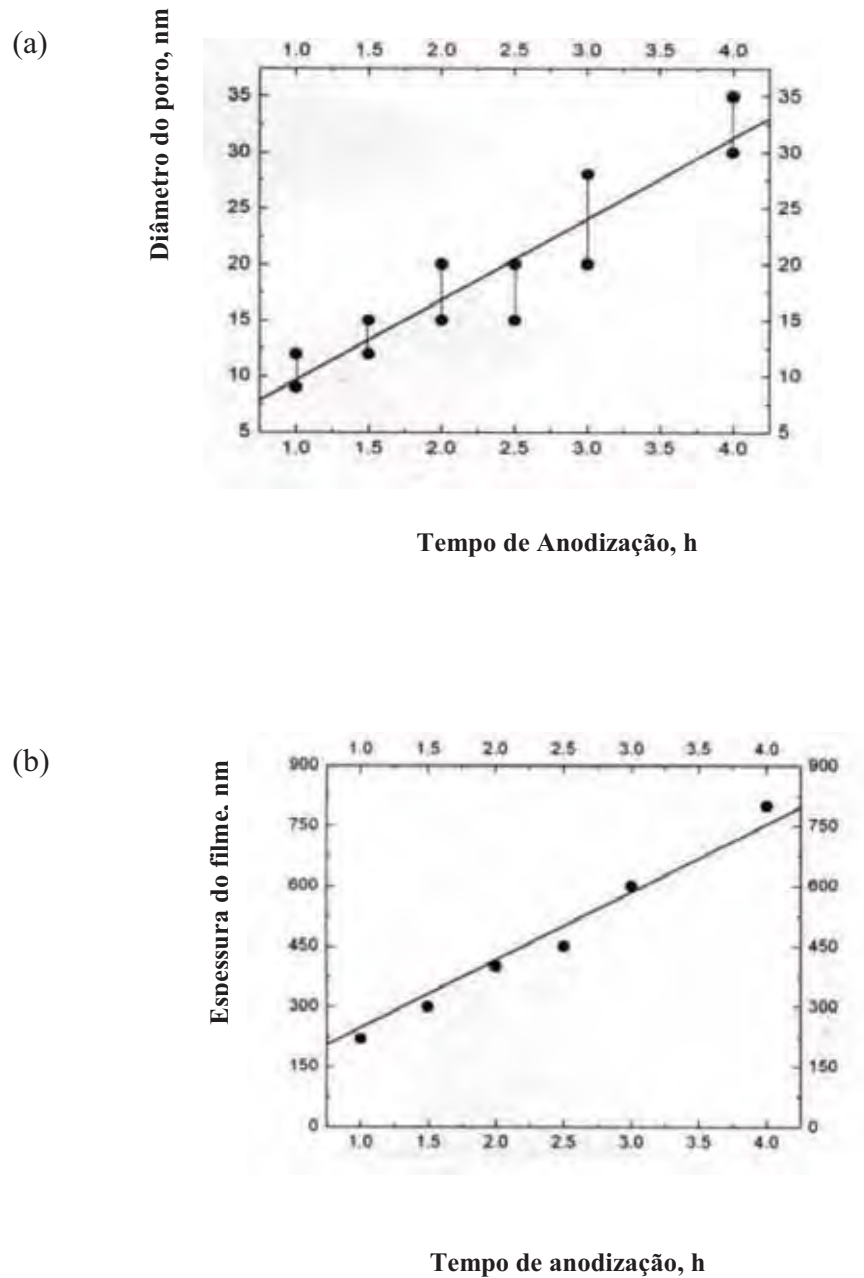


Figura 13- Gráficos obtidos por para anodização do tântalo CP na presença de $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HF}$: a) variação do diâmetro do poro em função do tempo de anodização e b) espessura da camada porosa do óxido de tântalo em função do tempo de anodização (adaptado de SIEBER; KANNAN; SGHMUKI, 2005)

Nos Quadros 2 e 3 é possível observar alguns estudos de oxidação anódica realizados nos últimos anos para o tântalo CP e para ligas do sistema binário titânio-tântalo, respectivamente.

Quadro 2 – Crescimento de nanotubos em tântalo CP

Pesquisador	Material	Eletrólito	Tensão	Tempo	Calcinação
Barton et al. (2009)	Ta CP	H ₂ SO ₄ + HF 3% (m/m), H ₂ O 12% (m/m)	30V	20 min	750°C-12h
		H ₂ SO ₄ + HF 1% (m/m), H ₂ O 4% (m/m)	55V		
		H ₂ SO ₄ + HF 2% (m/m), H ₂ O 5% (m/m)	25V		
El-Sayed e Birss (2010)	Ta CP	H ₂ SO ₄ + HF	14,5V	5s-60 min	
Allam, Feng, Grimes (2008)	Ta CP	H ₂ SO ₄ + HF + etilenoglicol ou DMSO ou H ₃ PO ₄	15V	20 min	300°C-1h
Sieber, Kannan, Scmuki (2005)	Ta CP	H ₂ SO ₄ + HF	20V	1-4h	
Ruck et al. (2009)	Ta CP	H ₂ SO ₄ + HF + DMSO	10--12 e 15V	20 min	
El-Sayed e Birss (2009)	Ta CP	H ₂ SO ₄ + HF	15V	5-10-20-60-90 e 120 segundos	

Quadro 3 – Crescimento de nanotubos para ligas do sistema binário Ti-Ta

Pesquisador	Material	Eletrólito	Tensão	Tempo	Calcinação
Tsuchiya et al. (2009)	Ti-xTa x=13, 25, 50 e 80%	H ₂ SO ₄ + HF H ₂ O	20V	12000s 200 min	
Jha, Hahn, Scmuki (2010)	Ti-35Ta	NaCl ₄ + NaCl H ₂ O : C ₂ H ₅ OH Tamponado em pH4	40V	2 min	700°C-3h

2.3 Avaliação celular

2.3.1. Adesão, proliferação e viabilidade

Os biomateriais podem ser avaliados empregando-se testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* são realizados com células enquanto os testes *in vivo* avaliam a resposta celular a partir da inserção do biomaterial a ser estudado em animais (JOHN, 2012). Entretanto, os ensaios celulares *in vitro* são a primeira escolha para o teste de um biomaterial, pois permitem uma avaliação rápida sobre informações de compatibilidade por meio de cultura de células de linhagem adequadas, evitando o sacrifício de animais nesse primeiro estágio da pesquisa (BRAMMER et al., 2008). Ensaio *in vitro* são o primeiro indicador de biocompatibilidade devido à citotoxicidade alterar padrões de metabolismo, características de cultura e crescimento (JOHN, 2012).

Alguns testes como adesão e proliferação celular fornecem informações primárias sobre o tipo de interação entre o material investigado e o hospedeiro. A adesão celular requer uma série de eventos sucessivos e podem demonstrar o grau de citotoxicidade a partir de uma simples contagem de células vivas e mortas. A maneira como as biomoléculas interagem e as características físicas do ancoramento mecânico sinalizam o caminho da proliferação celular na superfície investigada. Produtos da atividade celular como produção enzimática ou da matriz extracelular fornecem dados que podem também ser avaliados (BRAMMER et al., 2009; GEETHA et al., 2009; RATNER; BRYANT, 2004).

Assim na análise da biocompatibilidade, a adesão celular aos discos é a primeira etapa a ser considerada, as células que se mantêm em suspensão tem uma via de morte auto-induzida (apoptose); numa segunda etapa observa-se a proliferação celular, pois esta necessita de uma estabilização com o ambiente quando então as células reconhecem o substrato como biocompatível, sendo fornecidas condições, nuclear e celular, para que proteínas sejam formadas. Com isso ocorrerá a divisão celular povoando toda a superfície do material testado, sendo interrompida apenas quando as células entram em contato uma com a outra (SMITH et al., 2010).

Estudos recentes avaliaram a interação da morfologia da superfície com o comportamento celular usando diferentes tipos de células como miócitos, osteoblastos células epiteliais e fibroblastos. No estudo de biomateriais para implante dentário célula fibroblástica é indicada pois durante a formação dos tecido moles periodontais (gengiva e ligamento periodontal), os fibroblastos são as células responsáveis pela formação e manutenção de matriz extracelular e produção de fibras colágenas do ligamento periodontal (Ten Cate, 1989).

A nanoestrutura da superfície apresenta propriedades únicas que alteram a adesão celular por meio de mecanismos direto agindo na interação célula- superfície e indireto afetando a interação proteína- superfície (MENDONÇA et al., 2008). A resposta de células fibroblásticas na superfície de nanotubos de TiO_2 foi investigada por Smith et al. (2010, 2011) concluindo que a proliferação celular foi maior na superfície dos nanotubos de TiO_2 (Figura 14) e o número de células vivas mostrou um aumento significativo na superfície de nanotubos de TiO_2 (Figura 15).

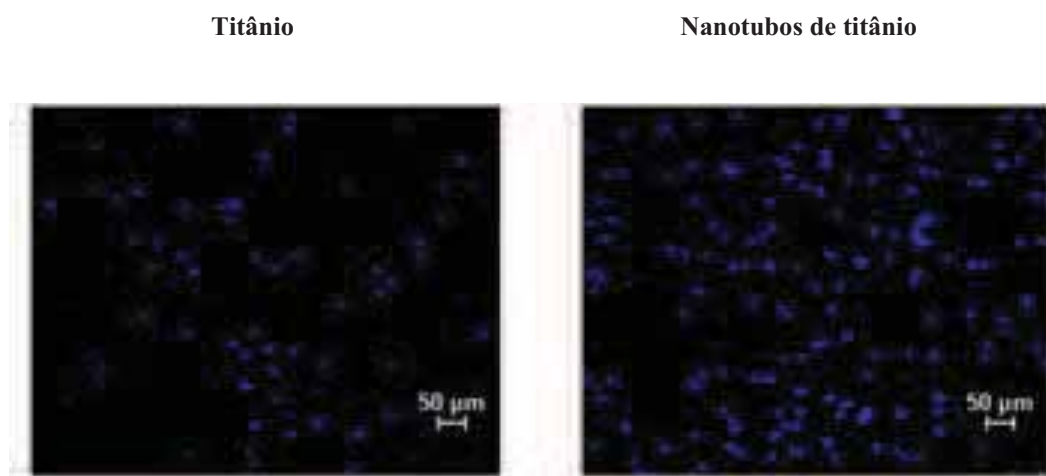


Figura 14- Imagens de microscópio de fluorescência de células fibroblásticas coradas com DAPI após 4 dias de cultura em titânio e nanotubos de titânio (adaptado de SMITH et al., 2011)

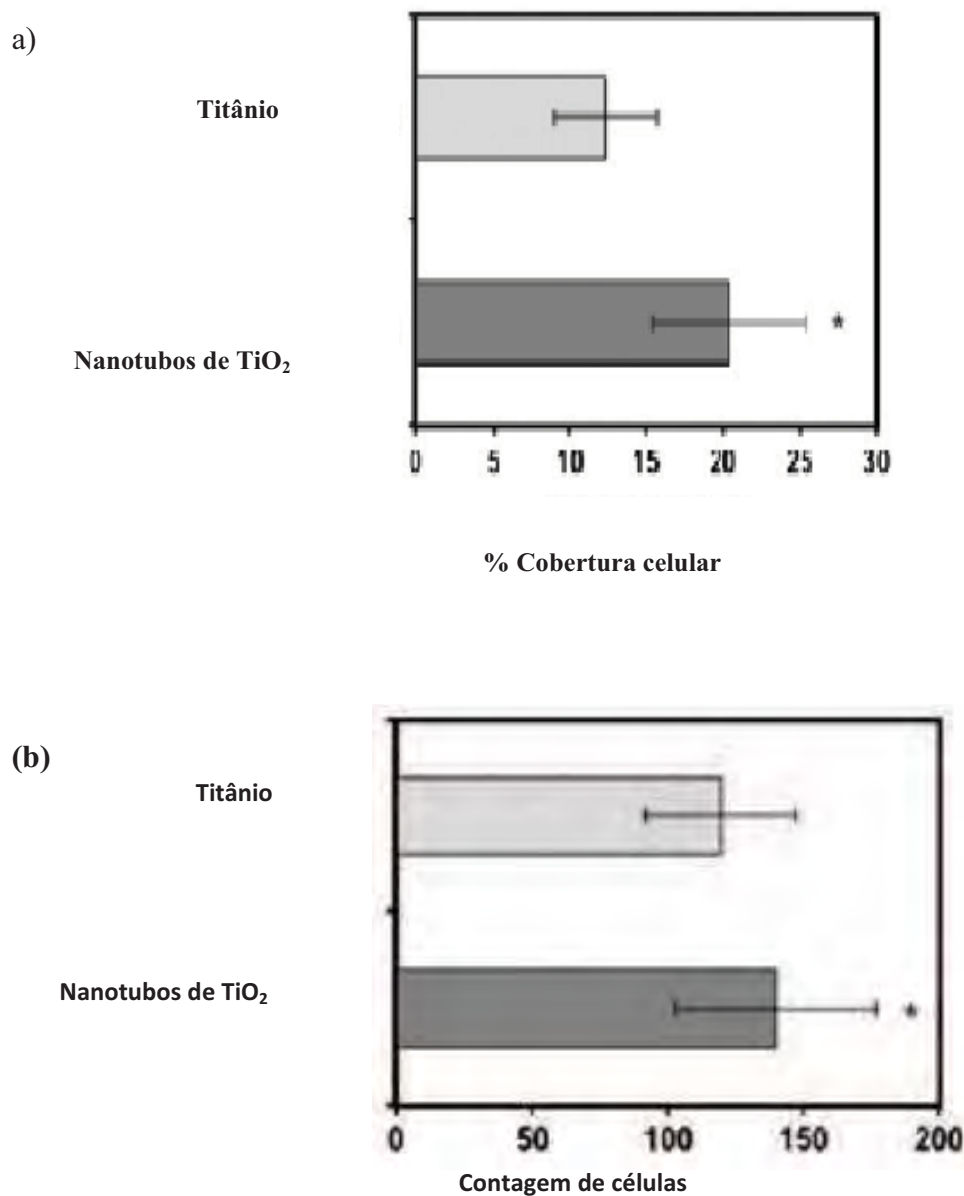


Figura 15- Gráfico da (a) cobertura celular e (b) contagem de células fibroblásticas em titânio e nanotubos de titânio (adaptado de SMITH et al., 2010)

O teste de MTT (metiltiazol) é um indicador calorimétrico de viabilidade celular (TIM, 1983), um importante parâmetro para avaliar a citotoxicidade de um material. O teste de citotoxicidade MTT avalia a atividade mitocondrial da célula a partir da sua incubação inicial em tetrazolato de brometo 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H como indicador colorimétrico da viabilidade celular. A enzima desidrogenase mitocondrial quando ativada

metaboliza o reagente MTT em um composto colorido, denominado formazan que pode ser medido através de espectrofotometria.

Oh e Jin (2006), Smith et al. (2010, 2011) e Ruckh et al. (2009) demonstram um aumento da atividade mitocondrial em nanotubos. Na figura 16 é possível observar valores de MTT obtidos em titânio CP e nanotubos de TiO_2 .

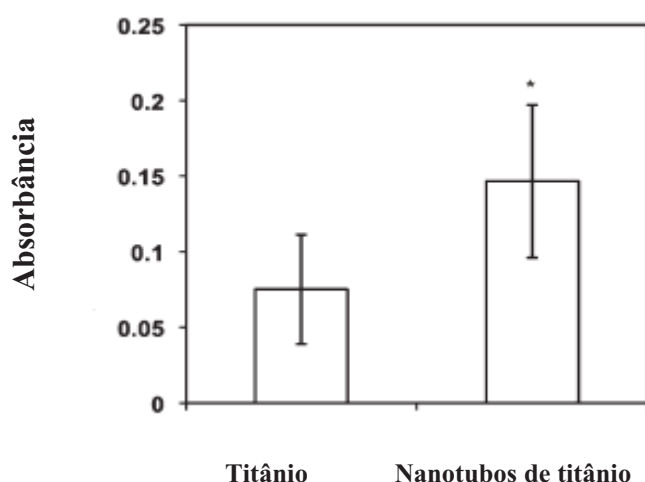


Figura 16- Teste MTT teste em titânio e nanotubos de titânio (adaptado de SMITH et al., 2010)

2.3.2 Citoesqueleto celular

A organização do citoesqueleto pode ser um indicativo da compatibilidade celular. O citoesqueleto é uma estrutura composta por uma rede de microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários, cuja organização é indicativo da comunicação intra e extracelulares, integração, recrutamento e diferenciação celular. A capacidade do citoesqueleto da célula de se reorganizar está relacionada com a saúde celular, reprodução mecânica de tecidos e células do tecido. A investigação do citoesqueleto pode ser realizada com a utilização do corante F-actin fornecendo informações de biocompatibilidade celular (OH et al., 2006,2009; RUCKH et al., 2009, 2010; SMITH et al., 2010, 2011).

Smith et al.(2011) investigaram o crescimento de células fibroblásticas após 4 dias de cultura em titânio e nanotubos de TiO_2 (Figura 17). O corante F-actin foi utilizado para identificar o citoesqueleto celular. Os resultados indicam maior numero de células na superfície de nanotubos de TiO_2 . Com comunicação intra e extracelulares e integração celular.

Estes resultados estão de acordo com os estudos de Das, Bose, Bandyopadhyay (2008) e Brammer et al. (2009).

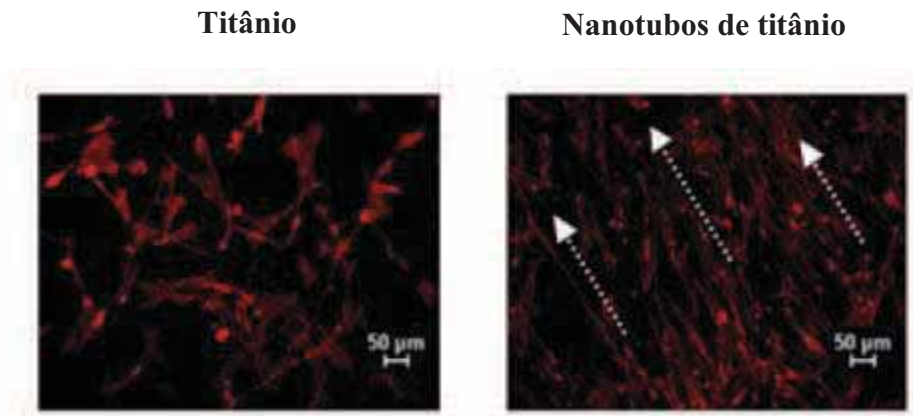


Figura 17 - Imagens de microscópio óptico de fluorescência de células fibroblásticas coradas com F-actin após 4 dias de cultura em titânio e nanotubos de titânio (adaptado de SMITH et al., 2011)

2.3.3 Morfologia celular

Smith et al. (2011) investigaram o crescimento de células fibroblásticas após quatro dias de cultura em titânio e nanotubos de TiO_2 (Figura 18). O autor conclui que as células fibroblásticas apresentam um aumento na ativação das células fibroblásticas assim como de formação de matriz extra celular. Estes resultados estão de acordo com Bauer et al.(2008), Roshasnorlyza et al. (2009), Oh et al. (2005) e Ruckh et al. (2009).

Smith et al. (2010) demonstraram um aumento da resposta de células em materiais com nanomorfologia, assim como Brammer et al.(2008, 2009) e Park et al.(2009) descreve que nanotubos com 100 nm de comprimento tem a melhor indicação para implantes ósseos devido ao estímulo no alongamento de osteoblastos o que está de acordo com os resultados apresentados por Oh e Jin (2006).

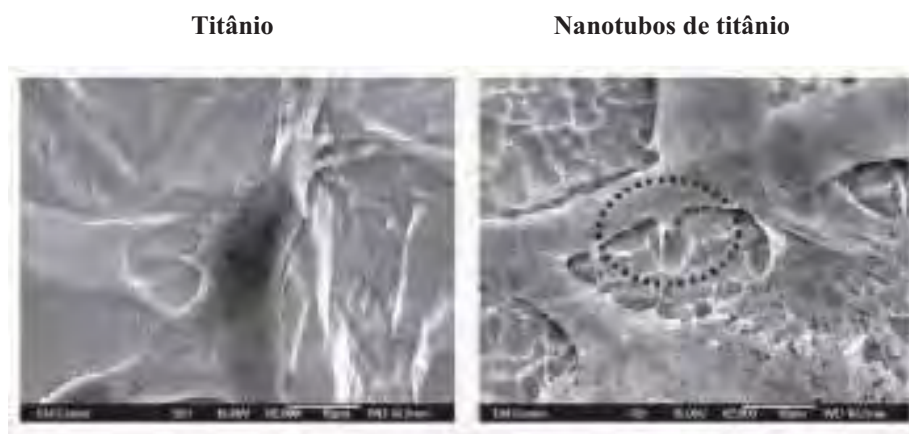


Figura 18- Morfologia das células fibroblásticas em titânio e nanotubo de TiO_2 (adaptado de SMITH et al., 2011)

Estudos têm sido realizados para tentar explicar a influência da energia de superfície de um material de implante sobre o comportamento celular (DEMETRECUS; PIRVU; MITRAN, 2010; BACAKOVA et al., 2011). A molhabilidade da superfície exerce efeito seletivo sobre a configuração e conformação das proteínas que são adsorvidas sobre um material implantado. Sendo assim a associação de fatores sorológicos com a superfície do material é influenciada pela energia de superfície, que é sensível à rugosidade e topografia da superfície do implante (BOYAN et al., 2003).

Groth e Altankov (1996) e Altankov, Grinnel, Groth (1996) investigaram a resposta de células fibroblásticas concluindo que superfícies hidrofílicas são mais favoráveis para adesão e proliferação celular.

A resposta de células mesenquimais na superfície hidrofóbica de nanotubos de TiO_2 foi avaliada por Bauer et al. (2008). Os autores concluíram que superfícies hidrofóbicas não são favoráveis a adesão e proliferação de células mesenquimais. Essa teoria foi comprovada por Das, Bose, Bandyopadhyay (2009) que investigaram a resposta de células osteoblásticas em superfícies cobertas de nanotubos de TiO_2 hidrofílicas concluindo que as células aderem e proliferam mais em superfície hidrofílica.

Demetrecus, Pirvu, Mitran (2010) cultivou células fibroblásticas na superfície de nanotubos de TiO_2 e avaliou influência do ângulo de contato na resposta celular, adesão, proliferação e viabilidade celular concluindo que a superfície tubular proporciona significativa melhora em todos os parâmetros avaliados o que está de acordo com os resultados de Roshasnorlyza et al. (2009) e Cheung et al.(2007) quanto a adesão, viabilidade e morfologia de fibroblastos em nanotubos de TiO_2 .

Bacakova et al. (2011) investigaram a influência do ângulo de contato na resposta celular para vários biomateriais. Células mesenquimais foram cultivadas na superfície das amostras e testadas para adesão e proliferação celular e morfologia celular. Os autores

concluíram que superfícies hidrofílicas melhoram a resposta celular indo de acordo com os resultados encontrados por Bauer et al. (2009) quanto ao ângulo de contato, viabilidade e morfologia celular.

No Quadro 3 pode ser observado alguns estudos de cultura celular relacionados com ângulo de contato adesão e proliferação celular, viabilidade, citoesqueleto e morfologia celular.

Quadro 4- Investigação celular

Pesquisador	Ângulo de contato	Adesão e proliferação	Viabilidade (MTT)	Citoesqueleto	Morfologia
Bacakova et al. (2010)	X	X			
Bauer et al. (2009)	X		X		X
Demetrecus, Pirvu, Mitran (2010)	X	X	X		
Smith et al. (2010)		X	X	X	X
Ruck et al. (2009)		X	X		X
Smith et al. (2010)		X	X	X	X
Roshasnorlyza et al. (2009)		X			X
Oh et al. (2005)		X	X		X
Cheung et al. (2007)		X	X		X
Das, Bose, Bandyopadhyay (2009)	X			X	
Brammer et al. (2008)		X	X	X	X
Vetrone et al. (2009)		X	X		X

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma da Figura 19 descreve as etapas empregadas durante a obtenção das amostras, oxidação anódica e caracterização da superfície.

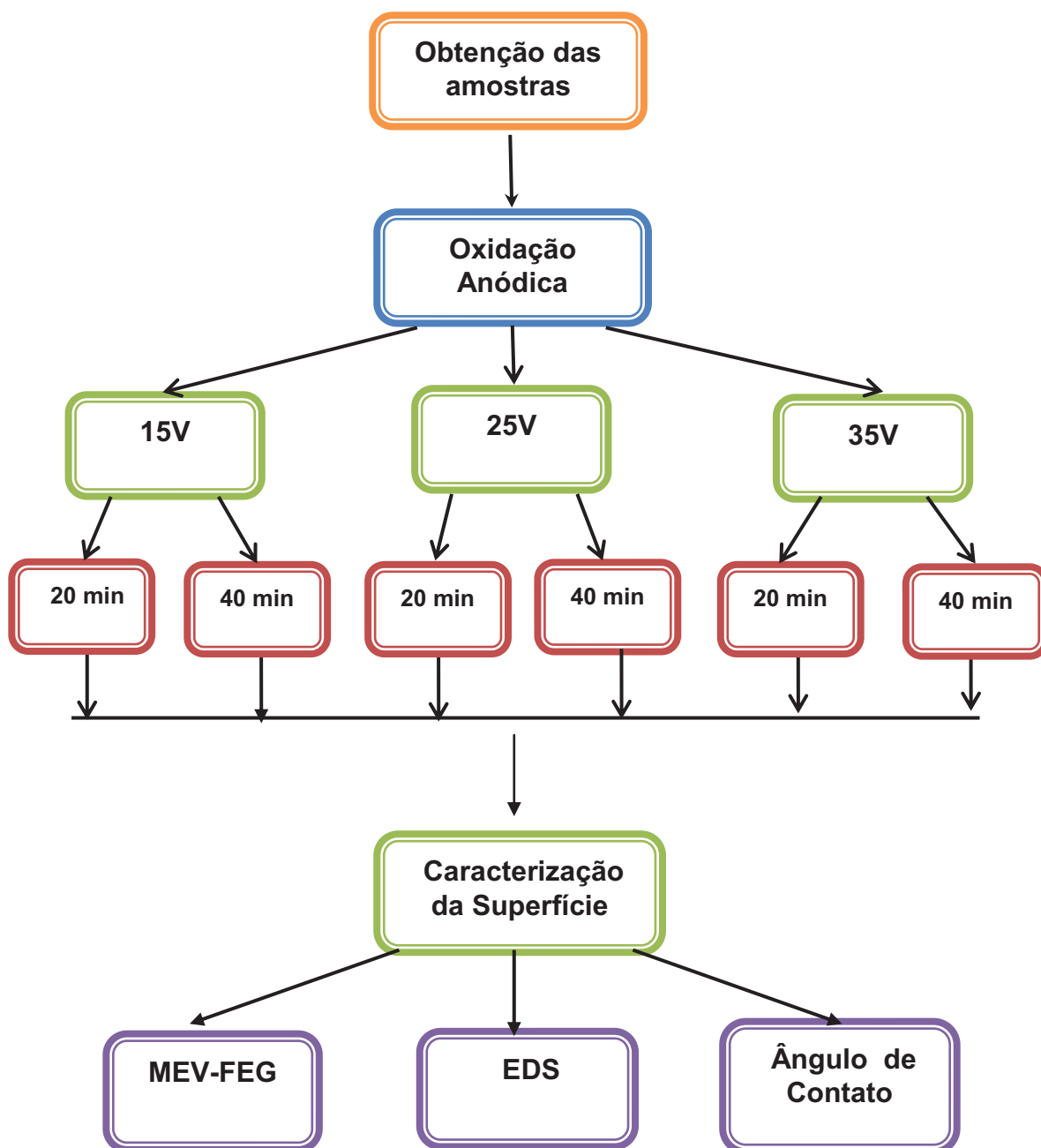


Figura 19 - Fluxograma da metodologia (1)

3.1 Preparo da liga e obtenção das amostras

As amostras da liga Ti-30Ta foram obtidas a partir da fusão de titânio CP (Sandinox) e tântalo CP (Sigma-Aldrich) em forno a arco voltaico com atmosfera inerte (gás argônio) e cadinho de cobre refrigerado a água (Figura 20 (a), (b) e (c)). Antes da fusão os metais foram limpos empregando decapagem química em solução formada por 50 mL de H_2SO_4 , 20 mL de HF, 20 mL de HNO_3 e 10 mL de água destilada e pesada de acordo com a composição estudada. O botão obtido com a fusão foi refundido de 7 a 10 vezes com o objetivo de homogeneizar a liga (Figura 20 (d)).

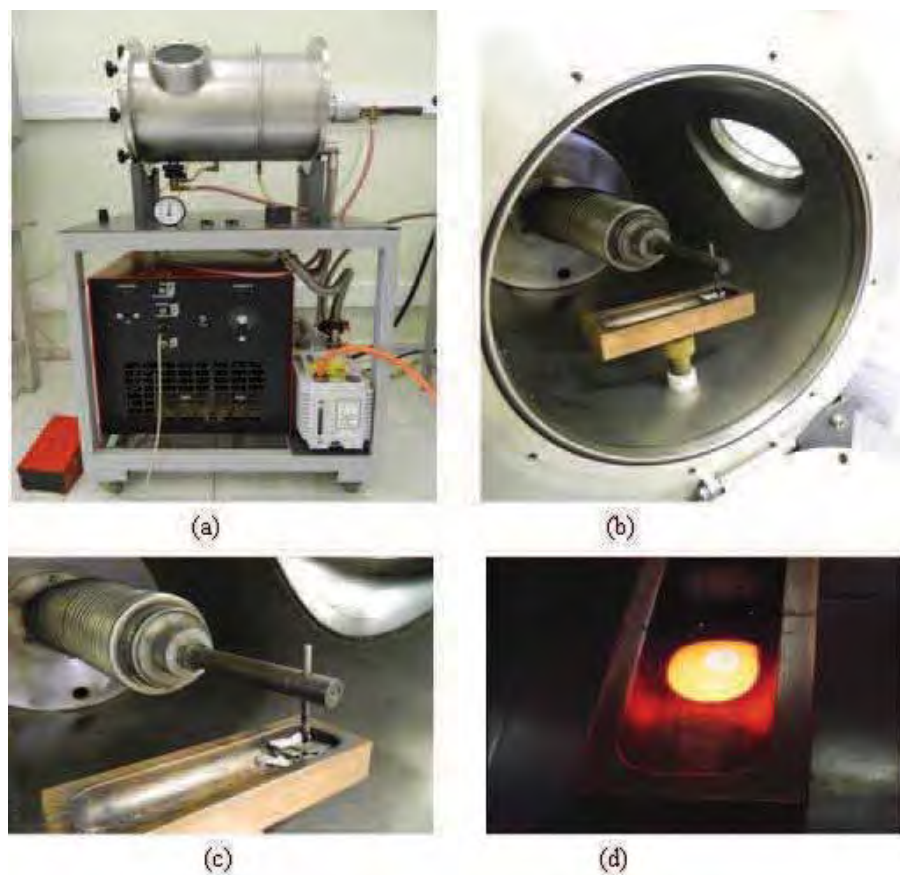


Figura 20- (a) Forno a arco voltaico, (b) Câmara do forno a arco voltaico e cadinho de cobre, (c) Detalhe do catodo - ponta de tungstênio (terminal positivo do arco) e anodo-cadinho de cobre (terminal negativo do arco), (d) botão da liga Ti-30Ta

O tratamento de solubilização foi realizado em forno tubular. O lingote obtido foi encapsulado a vácuo em tubo de quartzo devido a reatividade do titânio com oxigênio. A homogeneização dos lingotes foi realizada a 1000°C durante um período de 24 horas (Figura 21).



Figura 21 - Forno tubular usado para solubilização da liga Ti-30Ta (Detalhe do lingote encapsulado em tubo de quartzo)

Em seguida as amostras foram conformadas a frio de tal forma que ocorresse uma diminuição do diâmetro da amostra na ordem de 20%, . O forjamento rotativo foi realizado em equipamento FENN modelos 6F (2" até 3/8") e 3F (1/2" até 1/8"), com velocidade de 1700 rotações por minuto (rpm), 30 CV (HP) no Departamento de Engenharia de Materiais – EEL – USP (Figura 22).

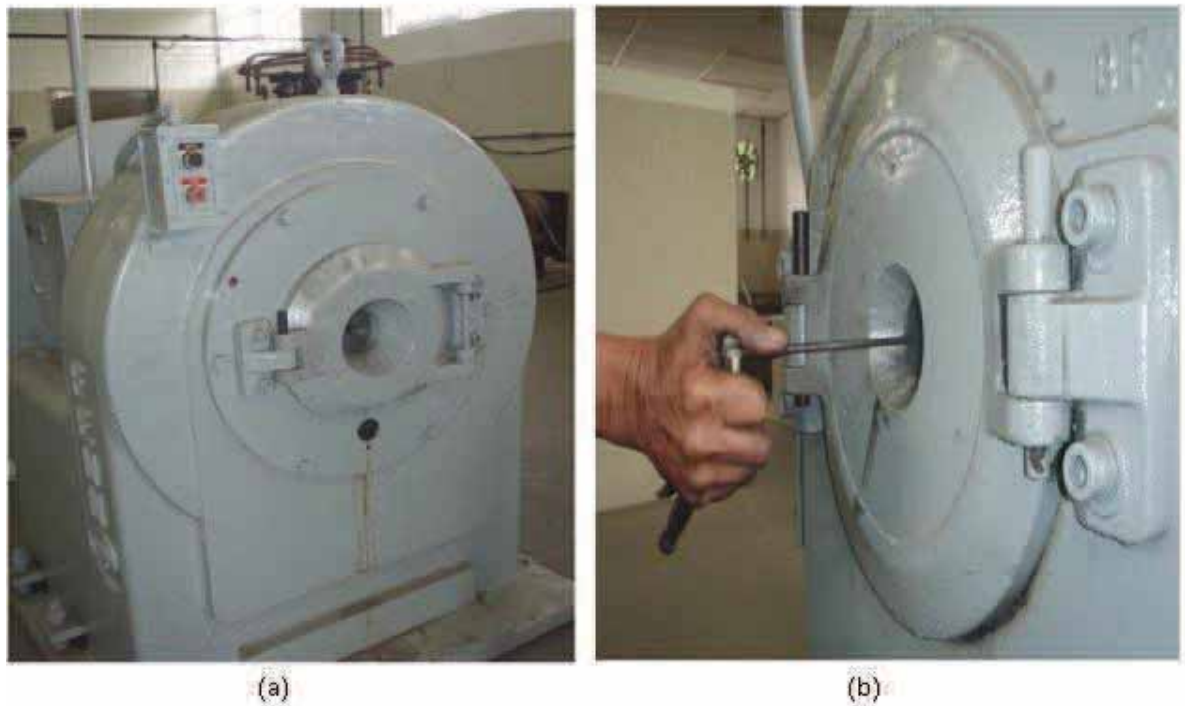


Figura 22- (a) Equipamento FENN modelos 6F e (b) Detalhe do lingote sendo introduzido na prensa rotativa

Os tarugos obtidos foram então cortados em maquina Isomet 4, Buehler resultando em discos com 3 mm de espessura e 13 mm de diâmetro (Figura 23).

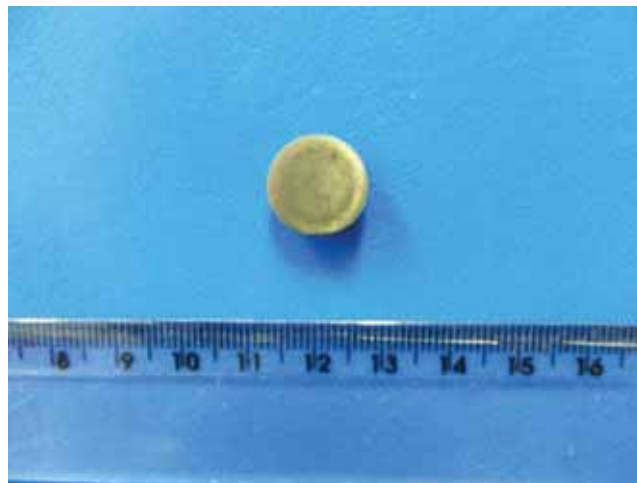


Figura 23 – Discos obtidos a partir da liga Ti-30Ta (13 mm de diâmetro e 3 mm de espessura)

3.2. Oxidação anódica da liga Ti-30Ta

As amostras foram divididas em três grupos de acordo com a tensão e dois subgrupos de acordo com o tempo de anodização (Tabela 1).

Tabela 1 – Grupos avaliados nesse estudo de acordo com os parâmetros de anodização

15V	25V	35V
20 min	20 min	20 min
40 min	40 min	40 min

Antes do início da oxidação anódica as amostras foram imersas em acetona por 3 minutos, lavadas 3 vezes em álcool isopropílico e água, esfregadas manualmente em sabão (Micro 90) e água corrente, lavadas 3 vezes em água destilada e álcool isopropílico, submetidas a ultrassom por 7 minutos imersas em álcool isopropílico, lavadas 3 vezes em álcool isopropílico e secas com gás nitrogênio. Foi utilizado como contra-eletrodo platina e como eletrodo de trabalho a liga Ti-30Ta, mantendo-se a uma distância constante entre os dois de 15 mm. Os eletrodos foram conectados a uma fonte de alimentação (cc) com limite máximo de 400 mA (Fisher Scientific FB 300 Electrophoresis). O processo de anodização foi realizado dentro de uma capela de exaustão de gases devido à toxicidade do experimento.

O eletrólito utilizado foi baseado na metodologia proposta por Allam, Feng, Grimes, (2008) para o tântalo puro. O eletrólito foi constituído por HF concentrado (48%) e H₂SO₄ (98%) na proporção volumétrica 1:9 com a adição de 5% dimetilsulfóxido (DMSO). O experimento foi realizado a temperatura ambiente e durante a sua realização foi mantida uma barra magnética imersa no eletrólito com agitação de 250 rpm. Ao término do processo as amostras foram lavadas três vezes em álcool isopropílico e secas com ar comprimido livre de óleo. Na figura 24 é possível observar a configuração da célula eletroquímica empregada nesse estudo.

Após a oxidação anódica as amostras foram calcinadas em forno resistivo a 530°C (1°C/min) por um período de 3 horas (Figura 25). Após essa etapa, todas as amostras foram mantidas em um dessecador até o momento da caracterização e avaliação biológica.

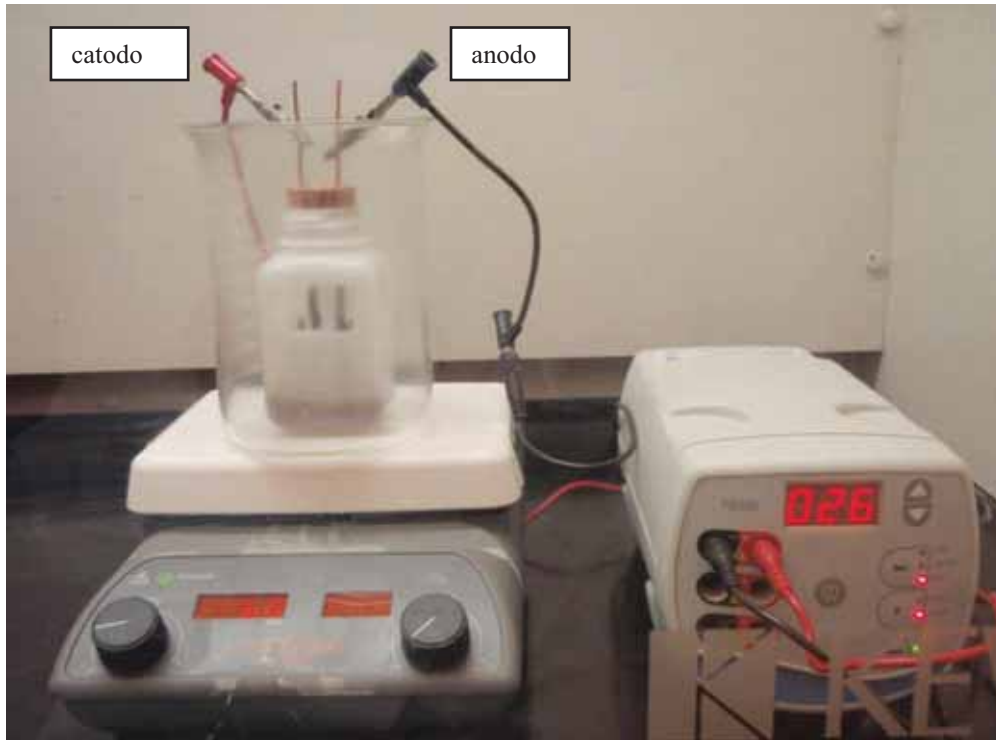


Figura 24 – Montagem empregada na anodização das amostras de Ti-30Ta



Figura 25 – Forno tipo mufla utilizado para calcinação da superfície a 530°C (1°C/min) por um período de 3 horas

3.3 Caracterização da superfície

A caracterização da superfície das amostras foi realizada empregando-se microscopia eletrônica de varredura, EDS (Espectrometria por Energia Dispersiva) e ângulo de contato.

3.3.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) e microsonda (EDS)

A caracterização da superfície das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6100) pertencente ao Departamento de Química da Universidade do Estado do Colorado - EUA (Figura 26). As amostras foram cobertas com uma camada de 15 nm de ouro. As imagens foram feitas em alta resolução, a 15 keV e a uma distância de trabalho de 10 mm. Para a obtenção das imagens transversais á superfície da liga Ti-30Ta anodizada a 35V-40 minutos foi riscada, a distância de trabalho foi alterada para 6, 5 mm e utilizou-se uma inclinação de 70°. A composição elementar da superfície foi determinada através de espectrômetro de energia dispersiva EDS (JEOL JSM 6100).



Figura 26- Microscópio eletrônico de varredura e EDS utilizada para investigar a superfície da liga Ti-30Ta anodizada

3.3.2 Medições de ângulo de contato

As medições de ângulo de contato foram realizadas em um goniômetro automatizado (DAS Kruss 10) equipado com uma câmera de vídeo pertencente ao Departamento de Química da Universidade do Estado do Colorado - EUA (Figura 27). A molhabilidade foi investigada empregando método de gota séssil, onde uma agulha dispensa água deionizada sobre a superfície e um programa de computador determina o ângulo entre a gota de água e a superfície. A característica hidrofílica é identificada quando o ângulo é menor que 90° e a característica hidrofóbica quando o ângulo é maior que 90° .

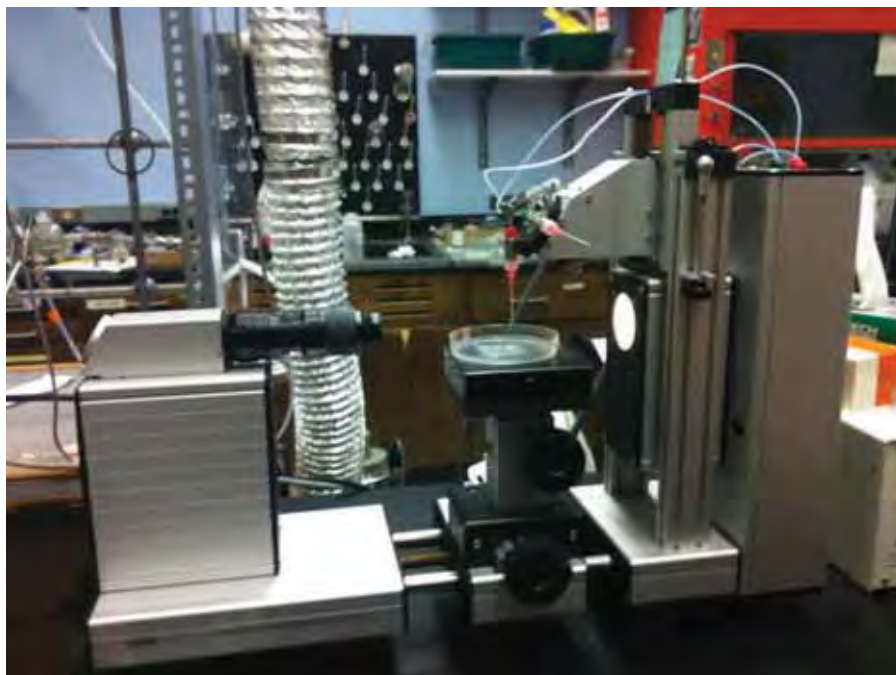


Figura 27 - Goniômetro utilizado para a investigação do ângulo de contato da superfície da liga Ti-30Ta anodizada

3.4 Cultura celular e avaliação biológica

Para a melhor condição obtida no processo de anodização foi realizada a avaliação celular. Os nanotubos na liga Ti-30Ta foram obtidos por meio do processo de anodização na condição 35V-40 min. Na Figura 28 pode ser observado o fluxograma das etapas empregadas durante a cultura de células fibroblásticas, cultivos na liga Ti-30Ta com nanotubos e os testes de avaliação celular.

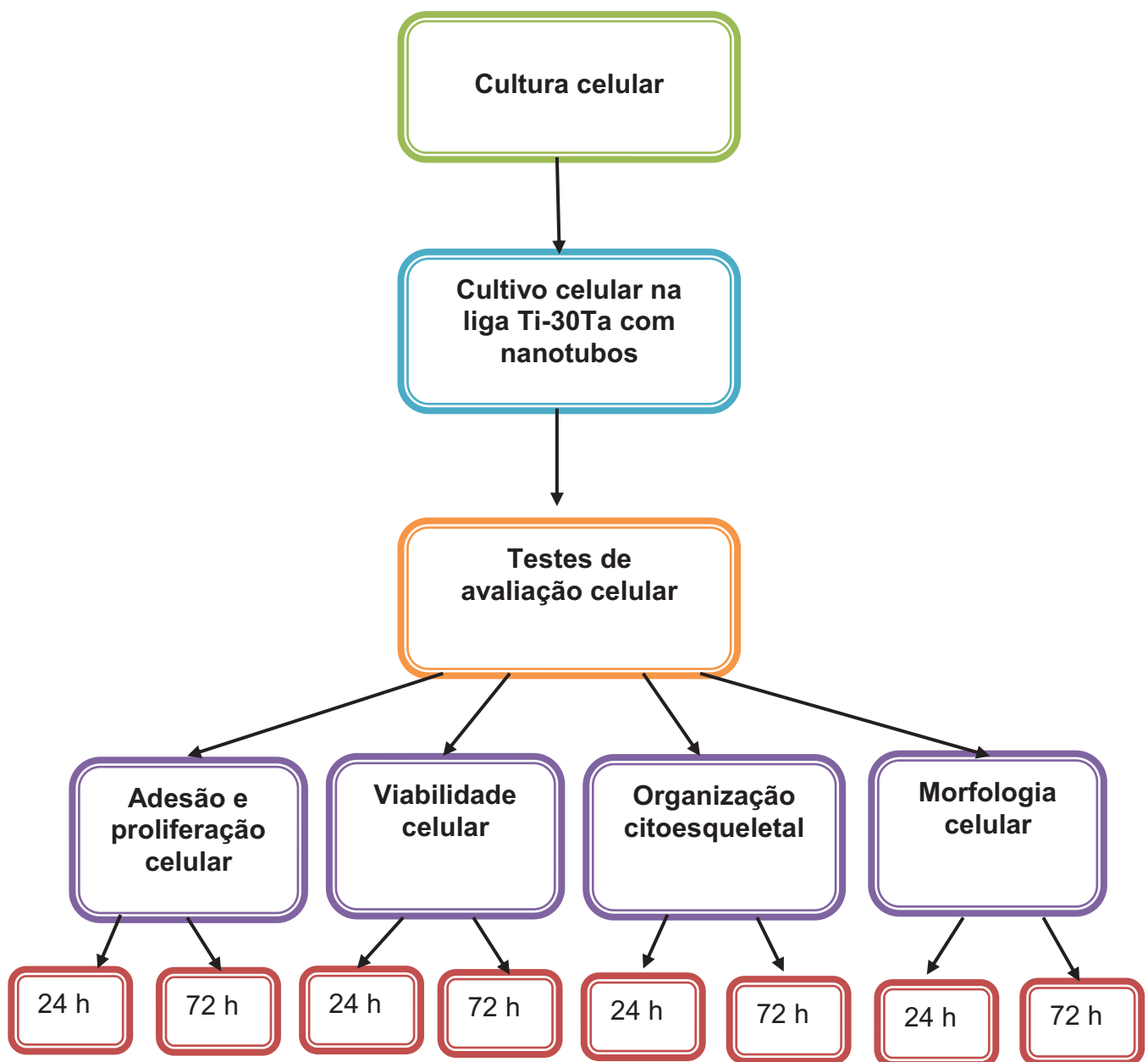


Figura 28 - Fluxograma da metodologia (2)

3.4.1 Cultura celular

Essa etapa foi realizada na Universidade do Colorado e contou com a supervisão do Dr. Ketul C. Popat. Células fibroblásticas dérmicas humanas (HDF, CLONETICS) foram isoladas de prepúcios neonatais, armazenadas durante 4 dias a -80°C e descongeladas em banho-maria a 37°C antes da cultura celular. Células HDF foram cultivadas em 13 ml de meio de cultura (Medium 106- Invitrogen) com suplemento de soro de crescimento (LSGS) e solução de gentamicina/anfotericina e incubadas em garrafas de cultivo de 75 cm^2 a 37°C e 5% CO_2 . A primeira troca do meio de cultura foi realizada entre 24-36 horas após a cultura inicial; alterações posteriores foram realizadas em dias alternados até que a população celular alcançou 50% de confluência, após o qual o meio de cultura passou a ser trocado integralmente todos os dias. A adesão e crescimento celular foram acompanhados em microscópio óptico invertido. Quando a população celular atingiu 70% de confluência as células foram removidas da garrafa de cultura utilizando-se solução de tripsina (0,025% de tripsina / EDTA) para digestão enzimática. Após um destacamento completo da superfície celular, um neutralizador de tripsina (0,5% soro fetal bovino em tampão fosfato salino (PBS)) foi adicionado para interromper a reação de tripsina. Uma concentração celular foi formada por centrifugação a 180 g por 7 minutos, o sobrenadante foi aspirado e as células HDF foram ressuspensas em meio de cultura em uma nova garrafa de cultura. Para determinar a densidade celular foi utilizado corante azul de tripano e contadas em um hemocitômetro. Os experimentos para este estudo foram realizados com células HDF de quarta passagem.

As células HDF foram semeadas na superfície das amostras anodizada na condição 35V- 40 min e no grupo controle em uma placa de 24 poços dentro de fluxo laminar contínuo ou capela biológica (Figura 29).



Figura 29 – Capela biológica com detalhe das placas de 24 poços empregadas para a cultura de célula contendo as amostras

Antes da cultura celular, todos os discos foram esterilizados em etanol 70% por 30 minutos, lavados duas vezes com PBS, secados ao ar livre, e submetido a 30 minutos de exposição aos raios UV. As células HDF foram semeadas á uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células /mL. Os discos foram incubados a 37 ° C e 5% de CO₂ em 1 mL de meio de cultura enriquecido e investigados para adesão, proliferação, viabilidade, morfologia celular e reorganização do citoesqueleto, após 24 e 72 horas de cultura.

3.4.2 Avaliação celular

3.4.2.1 Adesão, proliferação e viabilidade das células HDF na superfície da liga Ti-30Ta com nanotubos

Adesão e proliferação celular foram investigados usando calcein-AM (Invitrogen) e 4'6-diamidino-2-pHenyindole-dicloridrato (DAPI, Invitrogen). Imagens após 24 e 72 horas de cultura foram obtidas com um microscópio óptico de fluorescência. A aquisição das imagens foram realizadas com um microscópio de fluorescência (Axioplan 2 Zeiss) utilizando um conjunto de filtros 44 FITC BP 530/50 filtro verde (Zeiss). A porcentagem de cobertura celular nos discos foram avaliadas através das imagens em conjunto com o software ImageJ.

Antes da coloração, as células não-aderidas foram removidas do meio enriquecido por aspiração e os discos foram lavados cuidadosamente duas vezes com PBS. Os discos foram então transferidos para uma nova placa de 24 poços e incubadas com solução de 3 μ L calcein-AM em PBS por 20 min à temperatura ambiente e lavados novamente com PBS.

O número de células aderidas foi determinado por detecção nuclear. Antes da coloração do núcleo das células com DAPI, as células não-aderidas foram removidas do meio de cultura por aspiração. Os discos foram então transferidos para uma placa de 24 poços. Células aderidas foram coradas usando DAPI núcleo stain (diluição 1:50) com BSA 2% em PBS por 5 minutos. Os discos foram lavados duas vezes (5 minutos por lavagem) em PBS antes das imagens de fluorescência. O número de células aderidas sobre os discos foi determinado pelo número de núcleos corados por DAPI por meio de imagens de fluorescência utilizando o software ImageJ.

A viabilidade celular foi investigada com um kit comercial de Metiltiazol (MTT) (Sigma). Antes da realização do teste MTT, as células não-aderidas foram removidas do meio de cultura dos discos por aspiração e lavados com PBS. O protocolo padrão fornecido pelo fabricante foi seguido. Os discos foram transferidos para uma nova placa de 24 poços e incubados em solução MTT de 10% em PBS por 3,5 horas a 37 ° C e 5% de CO₂. Os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos em uma mesa agitadora adicionando uma mistura de 10% Triton-X em MTT solvente e em iguais quantidades de MTT em PBS. A absorbância da solução foi medida no comprimento de onda de 570 nm usando um leitor de placa (BMG Labtech). A absorbância líquida foi calculada subtraindo-se a absorbância de fundo em um comprimento de onda de 690 nm para determinar a viabilidade das células sobre os discos.

3.4.2.2 Organização citoesquelética de células HDF na superfície na superfície da liga Ti-30Ta com nanotubos

Aos discos previamente corados por DAPI foi acrescentado o corante F-actin para avaliar a organização do citoesqueleto através da fixação nas membranas celulares e investigados com microscópio óptico de fluorescência. Os mesmos foram incubados em conjugado faloidina- rodamina (diluição 1:40) por 20 min à temperatura ambiente. Os discos foram fotografados com um microscópio óptico de fluorescência usando DAPI BP 445/50 filtro azul e HQ Texas Red BP 560/40 filtro vermelho (Zeiss).

3.4.2.3 Morfologia das células HDF na superfície da liga Ti-30Ta com nanotubos

Ti-30Ta nanotubos

A morfologia celular foi investigada usando microscópio eletrônico de varredura para visualizar a interação celular com a arquitetura de nanotubos, após 24 e 72 horas de cultura. As células não-aderidas foram removidas do meio de cultura por aspiração e lavados com PBS. As células aderidas foram desidratadas e fixadas sobre as superfícies dos discos. As células foram fixadas por meio da incubação de uma solução fixadora primária (glutaraldeído a 3%, Sigma), cacodilato de sódio 0,1 mol/L (Polysciences), e 0,1 mol/L de sacarose (Sigma) por 45 min. Os discos foram então incubados em uma solução fixadora secundária (fixador primário sem glutaraldeído) por 10 min. Posteriormente, os discos foram desidratados por incubação em soluções consecutivas de concentrações crescentes de etanol (35%, 50%, 70% e 100%) por 10 min cada. A desidratação final das amostras foi realizada incubando os discos em hexametildissilazano (HMDS, Sigma) por 10 minutos e os discos armazenados em um dessecador.

3.5. Análise estatística

Cada experimento foi realizado em três diferentes discos ($n_{\min} = 3$). Todos os resultados quantitativos foram analisados através de uma análise de variância (ANOVA). O valor de significância estatística considerado foi $p < 0,05$. Durante a análise, as variações entre cada grupo não foram considerados iguais e uma amostra com dois testes-t abordagem foi utilizada para testar a significância entre as amostras anodizadas e o grupo controle.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização de superfície após oxidação anódica

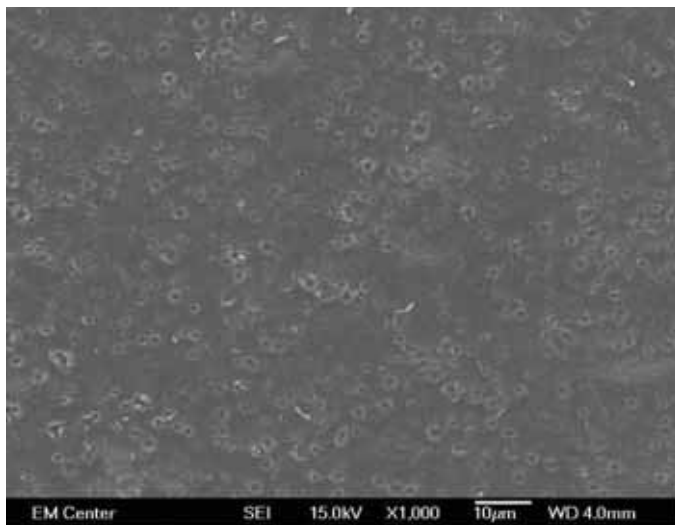
4.1.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) e microsonda (EDS)

Nesse estudo a oxidação anódica da liga Ti-30Ta foi avaliada sendo inicialmente testadas variações de tempo e tensão de anodização para um mesmo eletrólito, composto por ácido fluorídrico (HF) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) na proporção de 1:9 com adição de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO).

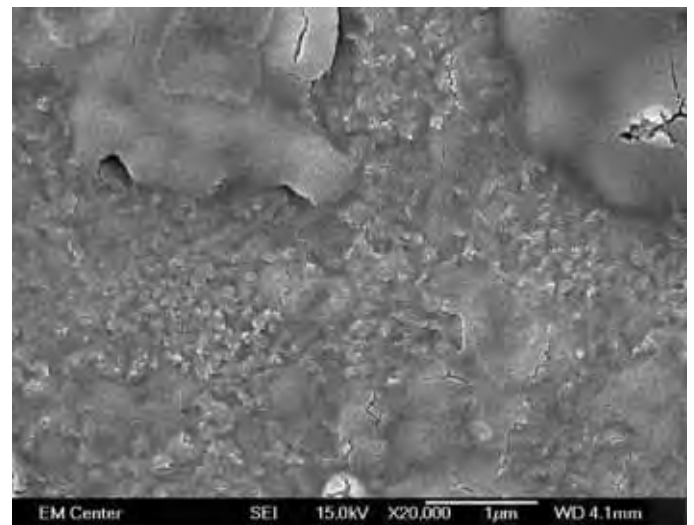
Na Figura 30 (a-c) pode ser observada a micrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura para a superfície da liga Ti-30Ta após anodização com aplicação de tensão de 15V durante 20 minutos, com diferentes aumentos. A superfície apresenta em menor aumento a presença de porosidades e em maior aumento morfologia não homogênea com trincas sem um padrão definido. Para o tântalo puro e mesmas condições de anodização, Ruckh et al. (2009) e Allam, Feng, Grimes (2008) obtiveram nanotubos com 11,1 µm de comprimento o que não foi obtido para a liga devido a composição. De acordo com Zhou et al. (2005) titânia são observados na superfície de titânio e suas ligas, porém não foram encontrados pelos autores para liga Ti-30Ta sendo mais estável a camada passiva de Ta₂O₅.

Maiores tempos de anodização para a mesma tensão levaram a obtenção de morfologias distintas. Na Figura 31 (a-c) pode ser observada a imagem obtida em microscópio eletrônico de varredura para a superfície da liga Ti-30Ta após anodização com aplicação de tensão de 15V durante 40 minutos, com diferentes aumentos. Pode ser verificada a presença de riscos na superfície na imagem de menor aumento, e formação de camada de óxido homogênea em toda a superfície em maior aumento. Estes resultados estão próximos ao verificados por Allam, Feng, Grimes (2008) para o tântalo CP com tensão de 20V- 20 min o que levou ao estudo da anodização com maiores valores de tensão.

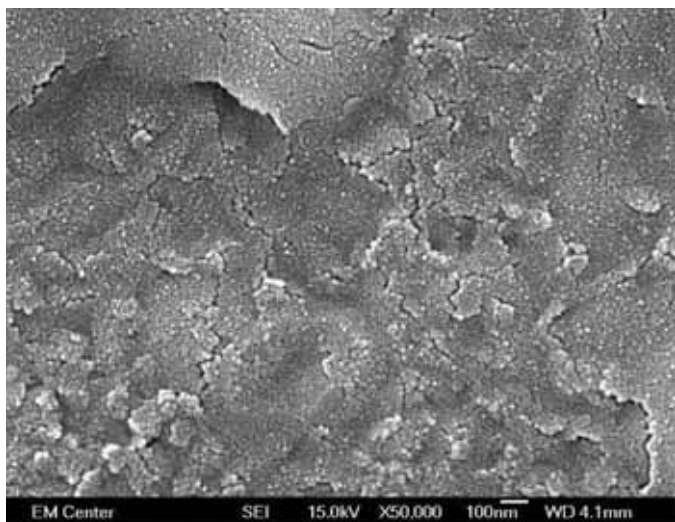
Os espectros obtidos para este grupo, após análise em EDS para as imagens de maior aumento, podem ser observados na Figura 30 (d) e 31 (d). Observou-se a presença de picos de titânio e tântalo condizente com a composição do substrato.



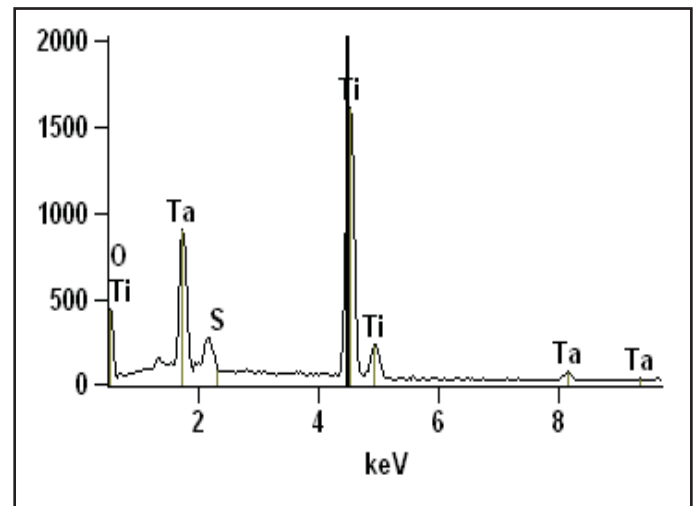
(a)



(b)

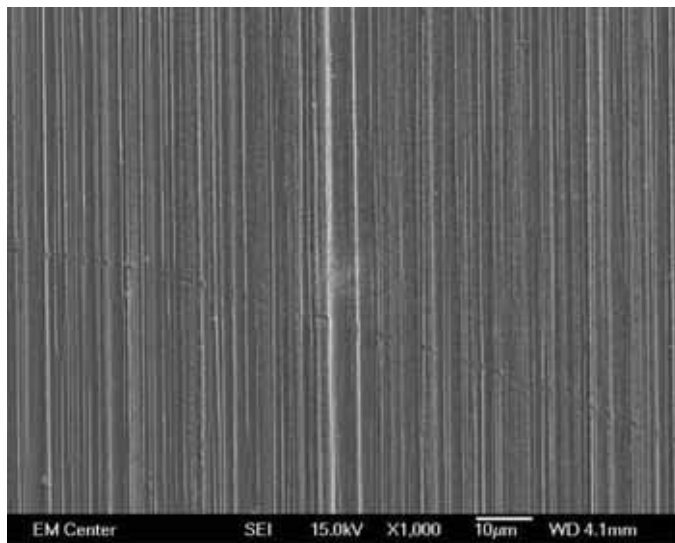


(c)

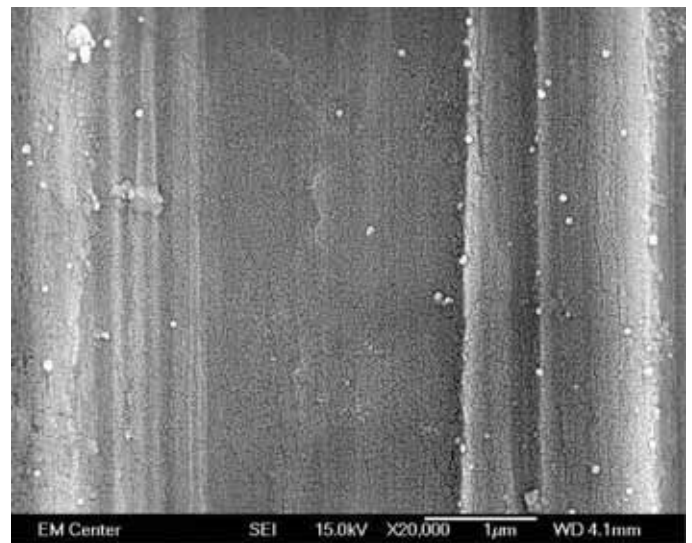


(d)

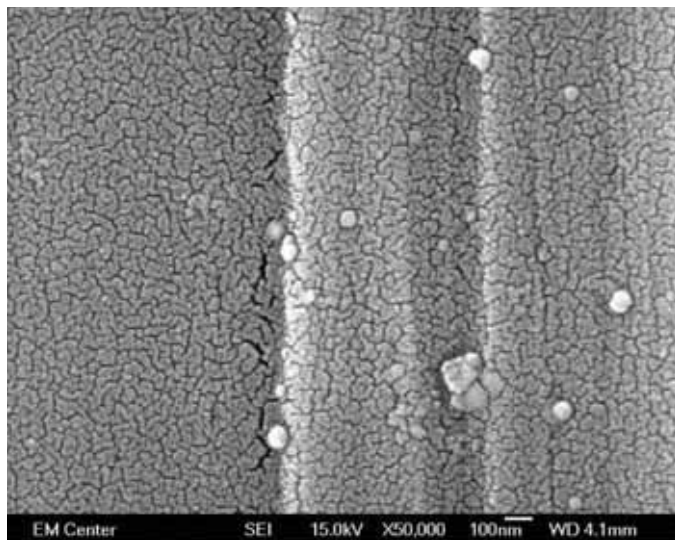
Figura 30 – (a-c) micrografia obtida em MEV-FEG para a liga Ti-30Ta após anodização em eletrólito HF + H₂SO₄ (1:9) + 5% DMSO (15V/20 min) e calcinação a 530°C- 3 h. (d) Detalhe da análise EDS da imagem de maior aumento.



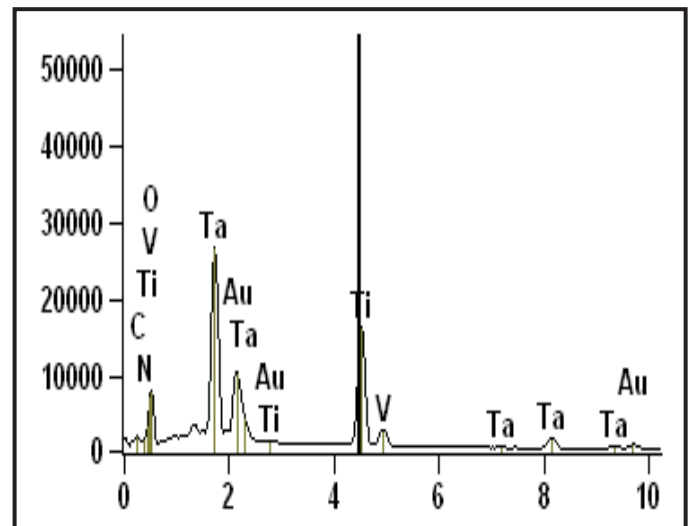
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 31 – (a-c) micrografia obtida em MEV-FEG para a liga Ti-30Ta após anodização em eletrólito HF + H₂SO₄ (1:9) + 5% DMSO (15V/40 min) e calcinação a 530°C- 3 h. (d) Detalhe da análise EDS da imagem de maior aumento

Para a tensão de 25V, nos diferentes tempos avaliados, 20 min e 40 min (Figura 32 (a-c) e 33 (a-c)), concluiu-se a partir da observação das imagens que, no menor tempo a espessura da camada de óxido formada foi mais fina e o tempo de 40 min mais espessa.

Isso porque se verificou que, em 25V-20 min (Figura 32 (a-c)) existe a presença de regiões localizadas de trincamento, enquanto, que para o tempo de 40 min provavelmente devido à formação de uma camada de maior espessura, ocorreu o trincamento homogêneo em toda a superfície. Esse trincamento ocorreu porque uma camada compacta de óxido foi formada durante a anodização, o que levou a formação de defeitos na secagem (trincas). De acordo com El-Sayed e Birrs (2009) esse é um problema que ocorre na formação de camadas de óxidos compactas sendo interessante a obtenção de uma superfície contendo regiões de nanotubos. Os resultados obtidos para 25V- 40 min (Figura 33 (a-c)) foram similares aos verificados por Barton et al. (2009) durante a análise da anodização de tântalo CP com eletrólito a base de água sem aditivo orgânico.

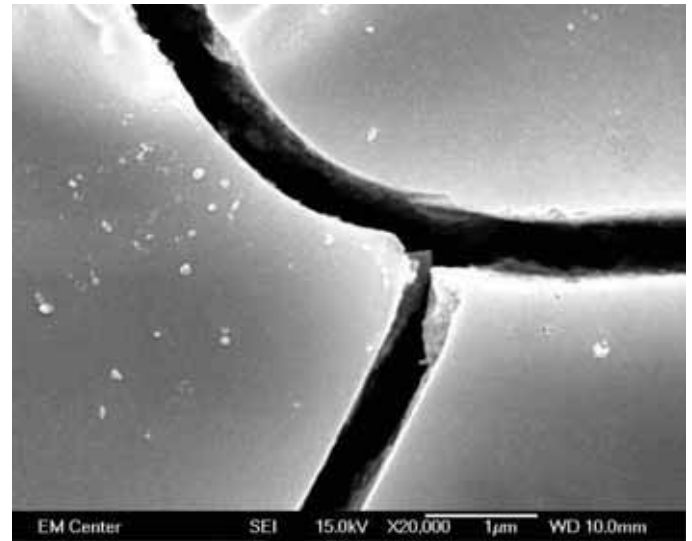
O aumento da tensão de 25V para 35V levou a formação de nanotubos em regiões ao longo da superfície. Na Figura 34 (a-c) pode ser observada a micrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura para a superfície da liga Ti-30Ta após anodização com aplicação de tensão de 35V durante 20 minutos, com diferentes aumentos. Na imagem de menor aumento não é possível observar a presença de nanotubos porque para essas condições as alterações na superfície apenas podem ser visíveis com aumentos acima de 20000X. Na imagem de maior aumento, é possível observar a formação de regiões contendo nanotubos.

A condição ideal foi obtida com tensão de 35V e tempo de anodização de 40 min (Figura 35 (a-c)). Devido ao aumento da espessura da camada que de acordo com a literatura esta diretamente relacionada com o tempo. Com o aumento da espessura da camada de óxido, possibilitou-se a dissolução e formação da camada de óxido compacta e a formação de nanotubos.

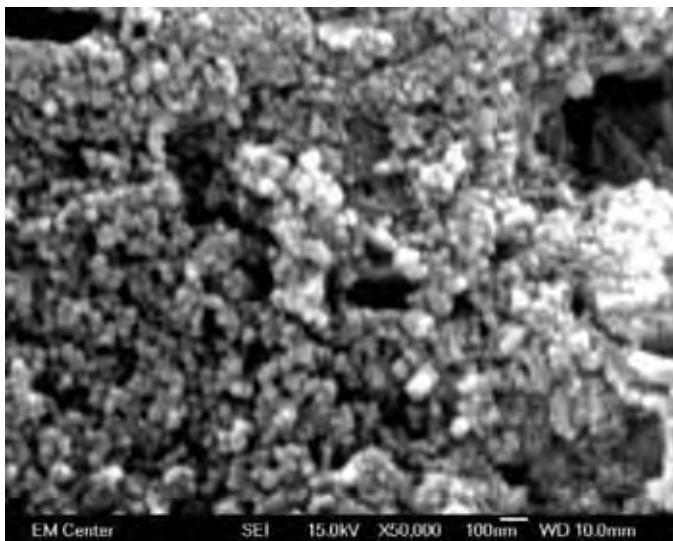
Na Figura 34 (d) e 35 (d) podem ser observados os gráficos de composição da superfície (EDS) que foram realizados para investigar a presença de titânio e tântalo em todas as condições de anodização. As análises indicaram quantidades comparáveis de titânio e tântalo presentes nos substratos.



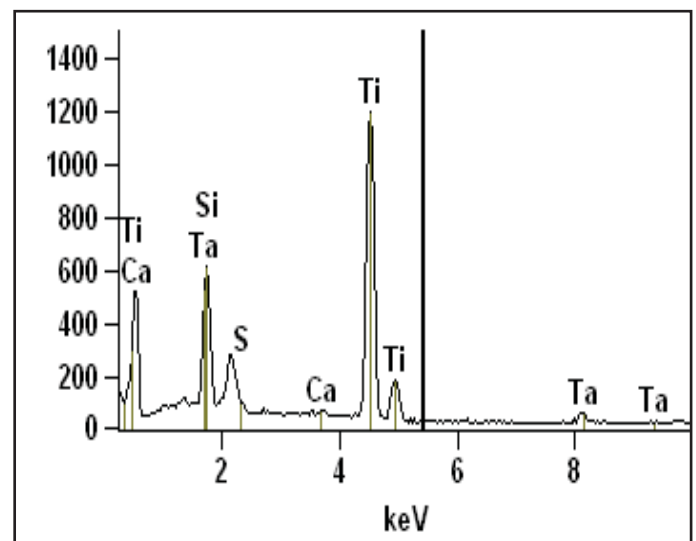
(a)



(b)

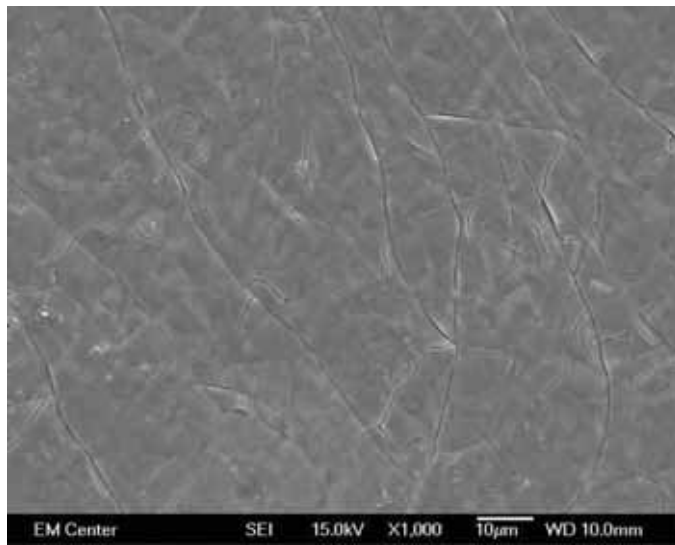


(c)

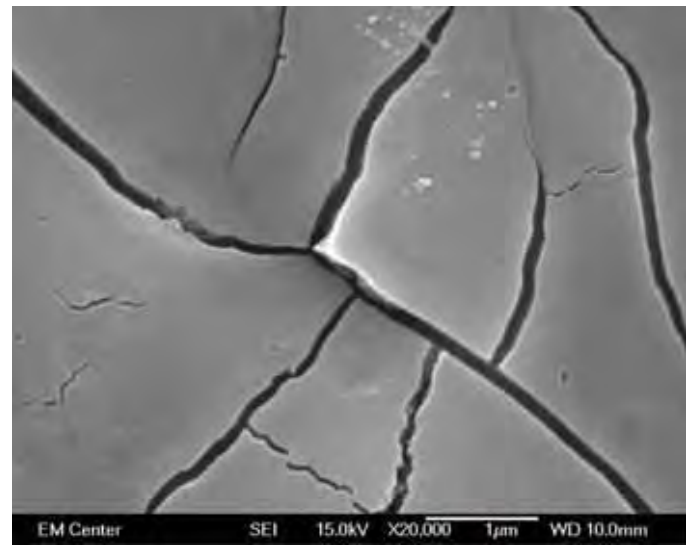


(d)

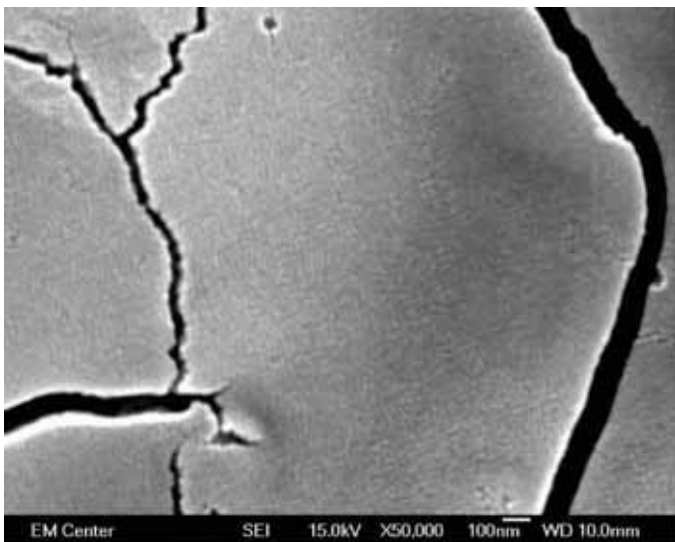
Figura 32– (a-c) micrografia obtida em MEV-FEG para a liga Ti-30Ta após anodização em eletrólito $\text{HF} + \text{H}_2\text{SO}_4$ (1:9) + 5% DMSO (25V/20 min) e calcinação a 530°C - 3 h. (d) Detalhe da análise EDS da imagem de maior aumento



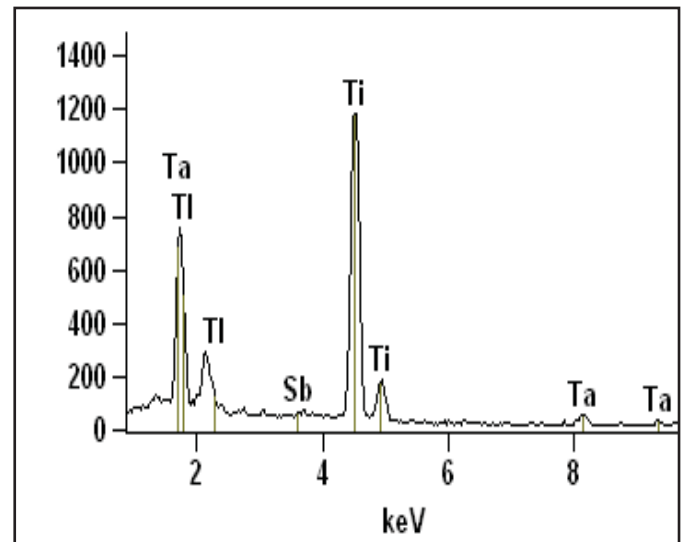
(a)



(b)

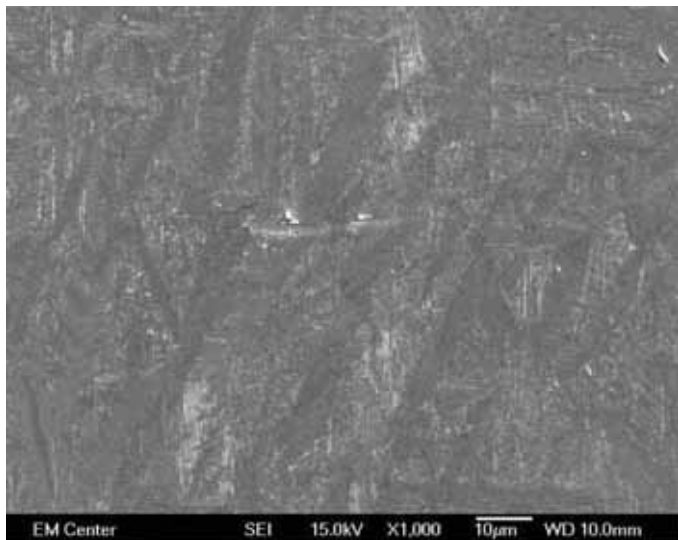


(c)

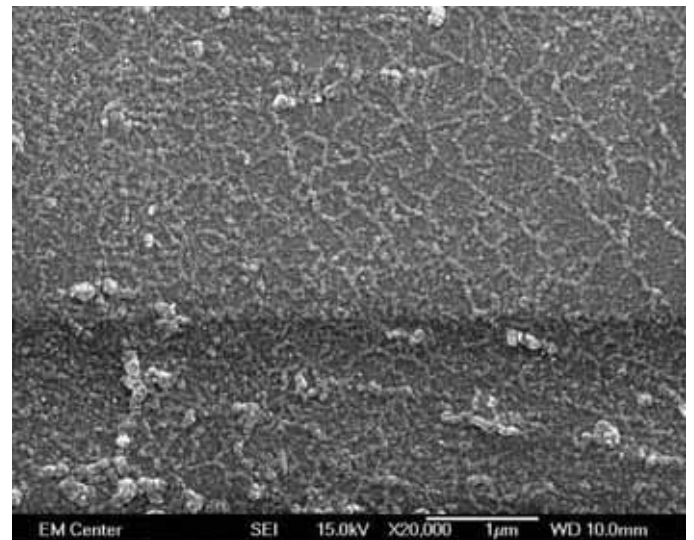


(d)

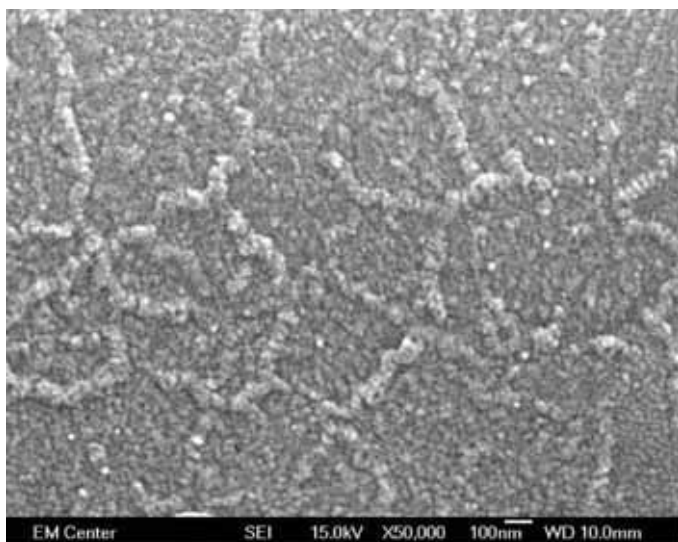
Figura 33 – (a-c) micrografia obtida em MEV-FEG para a liga Ti-30Ta após anodização em eletrólito HF + H₂SO₄ (1:9) + 5% DMSO (25V/40 min) e calcinação a 530°C- 3 h. (d) Detalhe da análise EDS da imagem de maior aumento



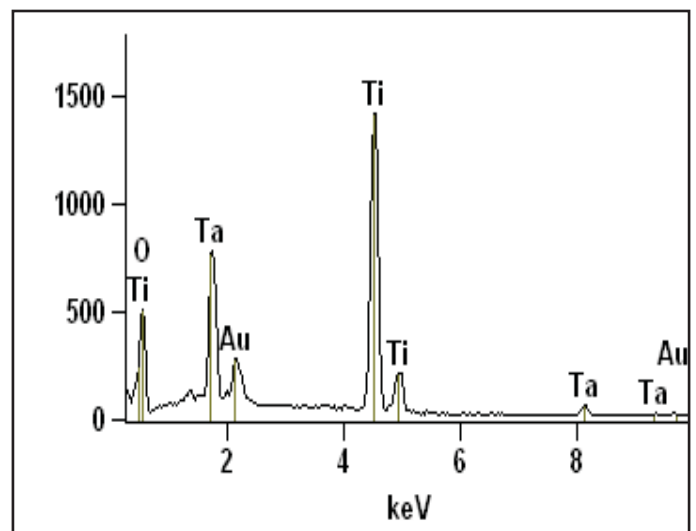
(a)



(b)

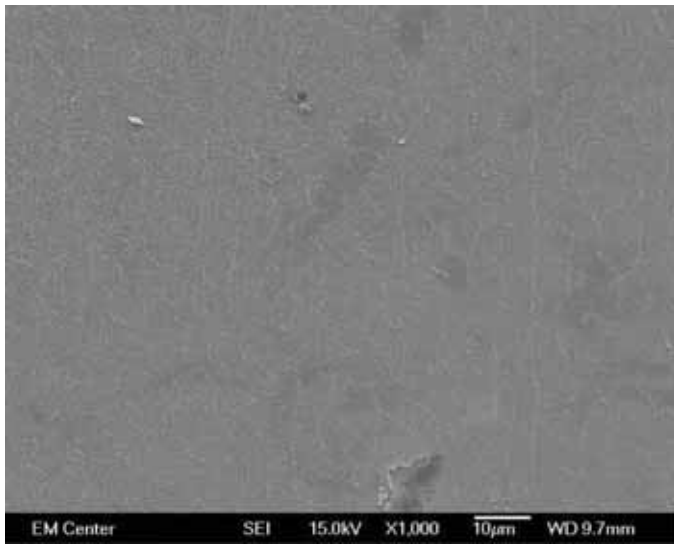


(c)

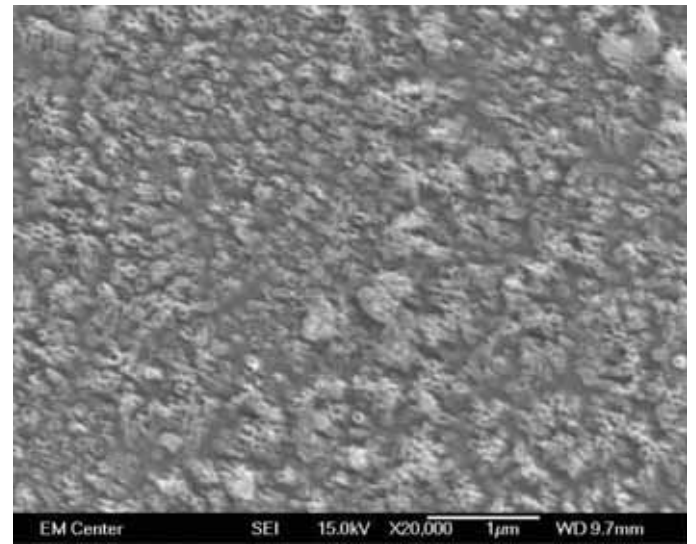


(d)

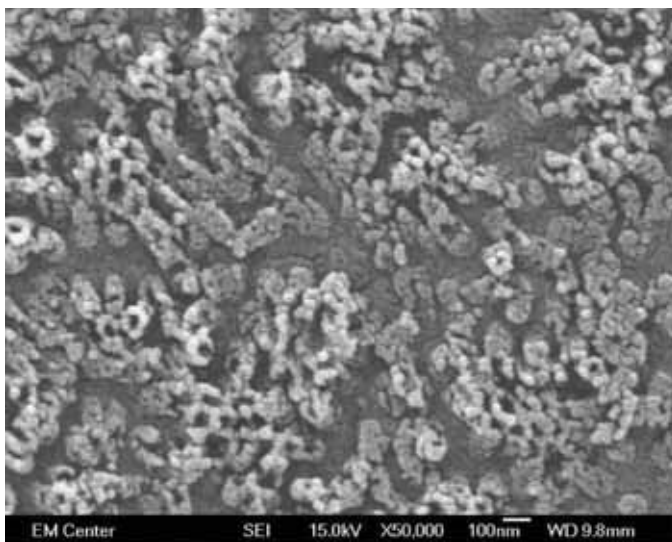
Figura 34 – (a-c) micrografia obtida em MEV-FEG para a liga Ti-30Ta após anodização em eletrólito HF + H₂SO₄ (1:9) + 5% DMSO (35V/20 min) e calcinação a 530°C- 3 h. (d) Detalhe da análise EDS da imagem de maior aumento



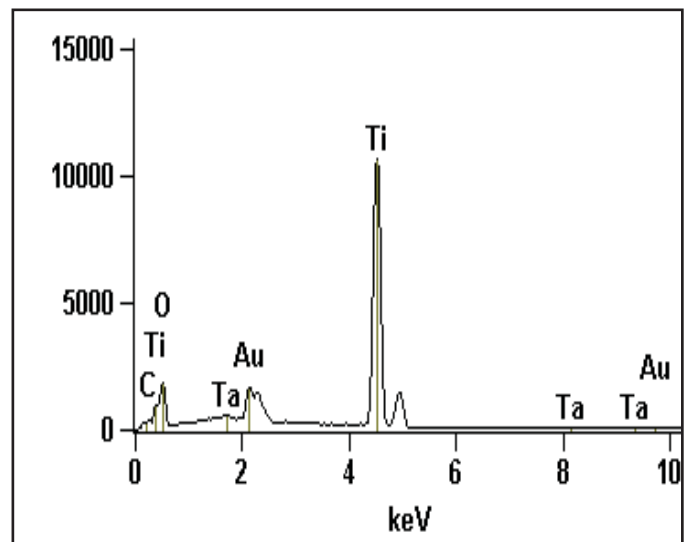
(a)



(b)



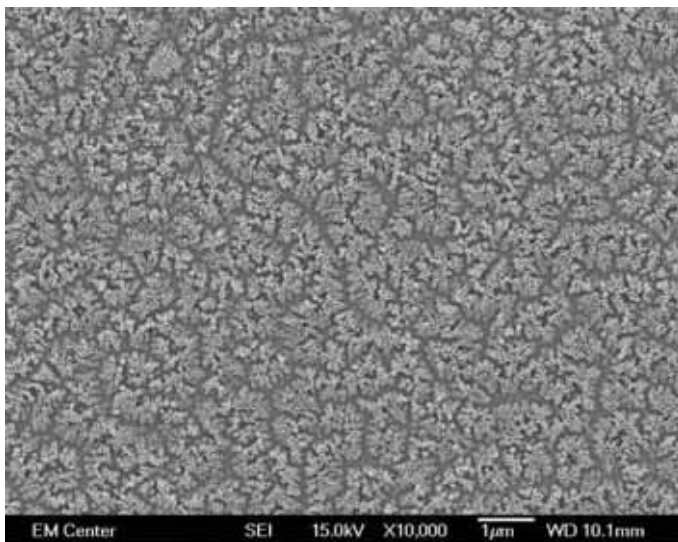
(c)



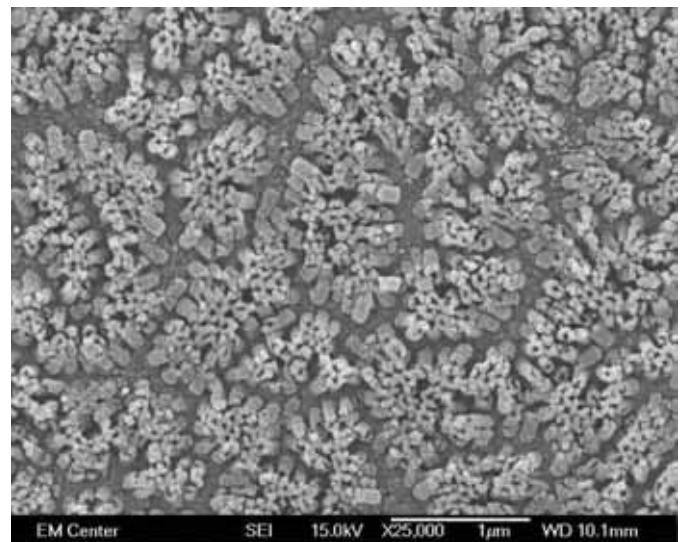
(d)

Figura 35 – (a-c) micrografia obtida em MEV-FEG para a liga Ti-30Ta após anodização em eletrólito HF + H₂SO₄ (1:9) + 5% DMSO (35V/40 min) e calcinação a 530°C- 3 h. (d) Detalhe da análise EDS da imagem de maior aumento

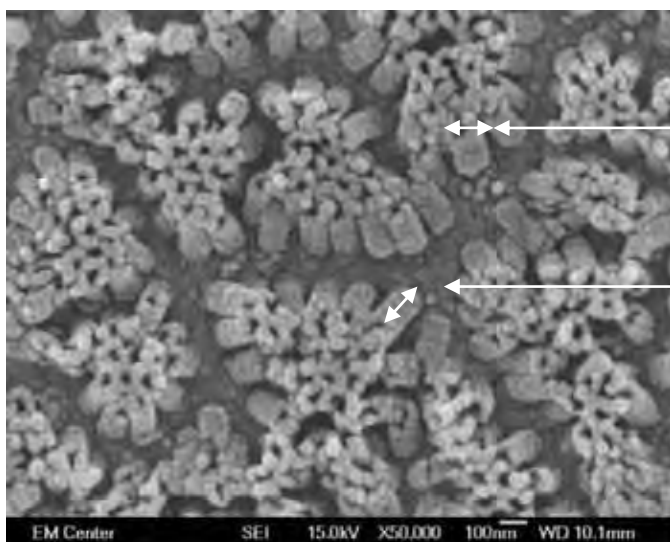
Na Figura 36 (a-c) pode ser observado a micrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura do topo da superfície da liga Ti-30Ta com nanotubos obtida na condição 35V-40min em diferentes aumentos. A superfície apresenta em menor aumento, nanotubos recobrindo toda a área de maneira homogênea, separados por regiões e em maior aumento nanotubos.



(a)



(b)



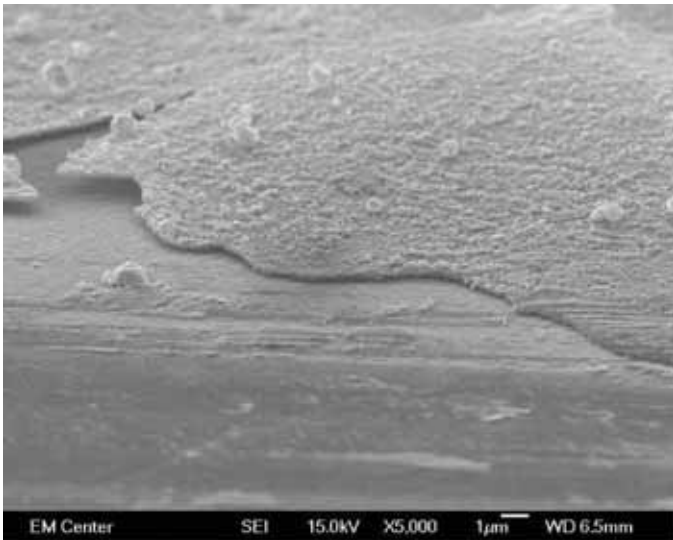
(c)

Diâmetro do nanotubo- 80-100 nm

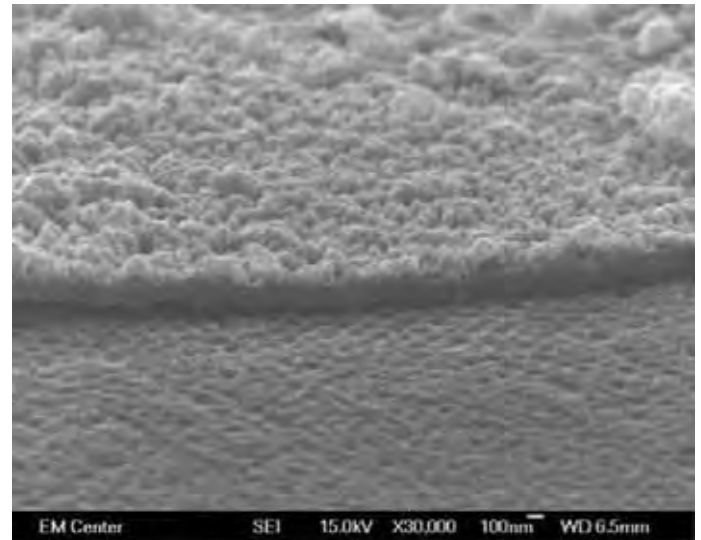
Comprimento do nanotubo- 100 nm

Figura 36– (a-c) micrografia obtida em MEV-FEG para a liga Ti-30Ta após anodização em eletrólito HF + H₂SO₄ (1:9) + 5% DMSO (35V/40 min) e calcinação a 530°C- 3 h em diferentes aumentos. Vista de topo.

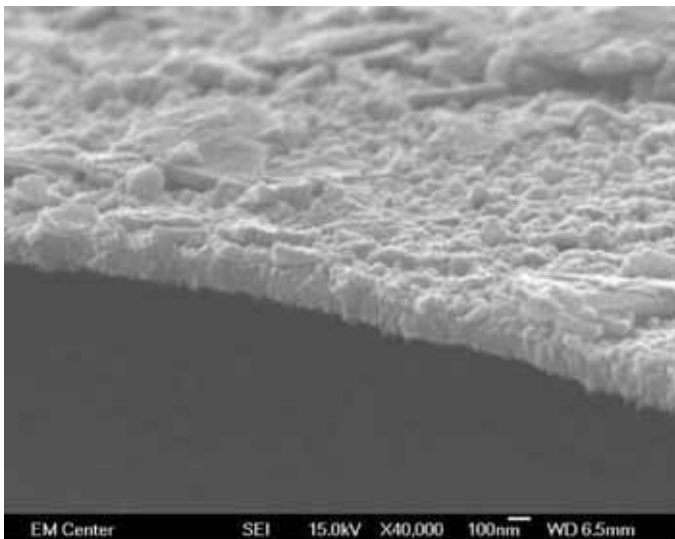
Na Figura 37 (a-d) pode ser observada uma imagem lateral dos nanotubos de Ti-30Ta paralelos após descolamento da camada. Na superfície abaixo da camada formada pelos nanotubos podem ser observados *dimples*, os quais originaram a formação nanotubular (Figura 37 (b)). Com o auxílio do programa Image J foi possível obter as medidas relacionadas com a geometria dos nanotubos, diâmetro de 80- 100 nm e comprimento de 100nm.



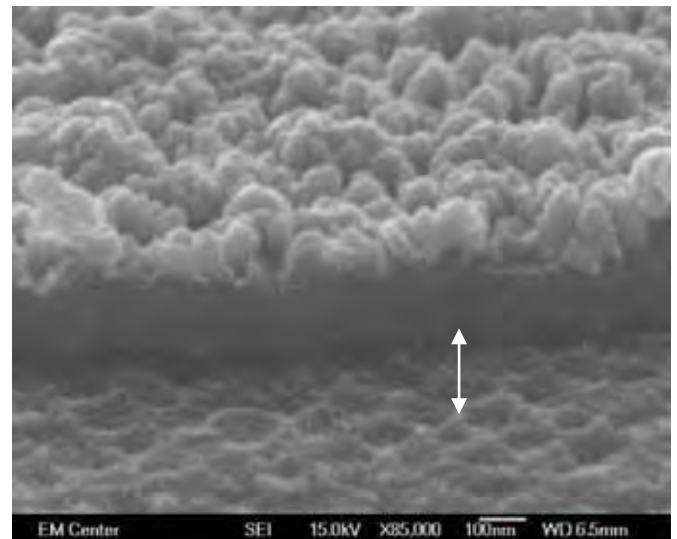
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 37 – (a-d) micrografia obtida em MEV-FEG para a liga Ti-30Ta após anodização em eletrólito $\text{HF} + \text{H}_2\text{SO}_4$ (1:9) + 5% DMSO (35V/40 min) e calcinação a 530°C- 3 h em diferentes aumentos. Vista lateral.

4.1.2 Medida do ângulo de contato

Em aplicações biomédicas a hidrofiliabilidade é uma condição desejável, pois superfícies hidrofílicas promovem uma interação celular aumentada. Estudos anteriores já haviam relacionado à energia de superfície de um biomaterial com funcionalidade celular, tais como adsorção de proteínas, a adesão e ativação plaquetária levando a coagulação do sangue e

adesão bacteriana (ALTANKOV;GRINNEL; GROTH, 1996; BACAKOVA et al., 2011; BAUER et al., 2008; DAS; BOSE; BANDYOPADHYAY, 2009; DEMETRECU; PIRVU; MITRAN, 2010; LANG et al., 2011). Na Tabela 2 podem ser observados os valores do ângulo de contato obtidos para as condições avaliadas e a forma típica das gotas para cada superfície formada.

Na Figura 38 pode ser observado um gráfico comparativo das condições de anodização e do grupo controle. De acordo com os dados obtidos todas as superfícies são hidrofílicas ($< 90^\circ$) podendo ser representados do menor ângulo para o maior como segue: 15V-40 min (14, 15°), 35V-40 min (15, 04°), 15V-20 min (15, 68°), 25V-40 min (16, 41°), 25V-20 min (21, 27°), 35V-20 min (48, 61°). As cinco primeiras condições apresentam valores de ângulo de contato próximos o que num primeiro momento torna o seu uso indicado. Como apenas a condição 35V-40 min apresentou a formação de nanotubos esses resultados corroboraram para a sua escolha quando da avaliação celular. É interessante observar que valores maiores de ângulo de contato podem estar associados à formação de camadas de óxido compactas.

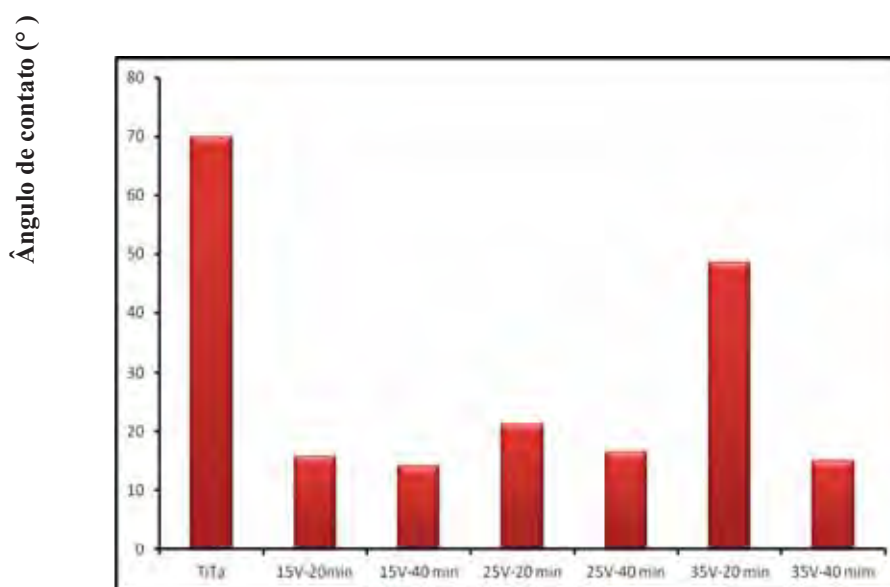


Figura 38 – Gráfico do ângulo de contato do grupo controle e das condições de anodização da liga Ti-30Ta

Tabela 2 – Valores de ângulo de contato para as condições de anodização avaliadas

Parâmetros de Anodização	Ângulo de Contato (Média $\pm$ Desvio Padrão)	
15V-20min	15,68 $\pm$ 3,46	
15V-40 min	14,15 $\pm$ 3,63	
25V-20 min	21,27 $\pm$ 2,536	
25V-40 min	16,41 $\pm$ 0,94	
35V-20 min	48,61 $\pm$ 2,51	
35V-40 min	15,04 $\pm$ 5,98	

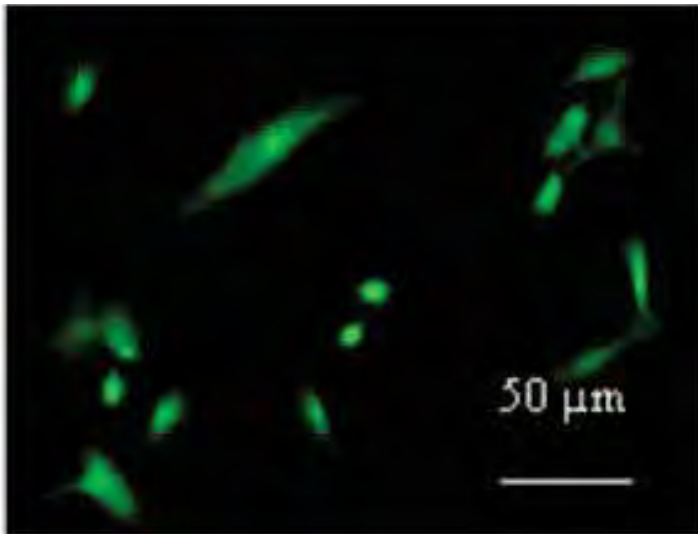
4.2 Avaliação celular

4.2.1 Adesão, proliferação e viabilidade celular

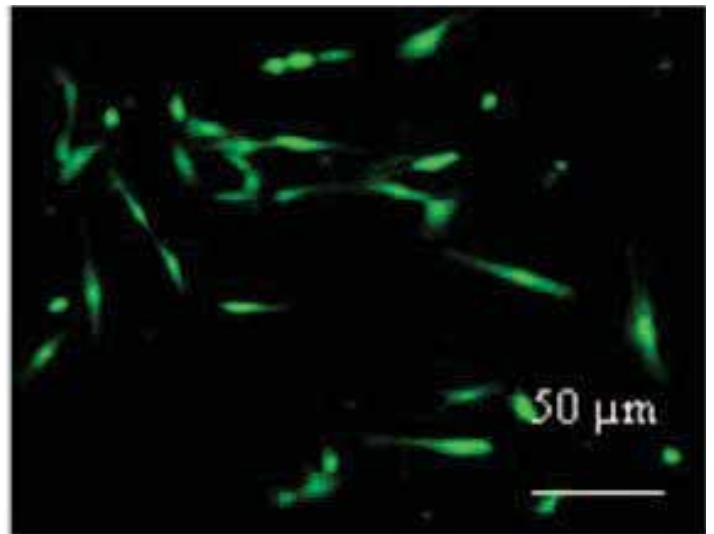
Após a escolha da melhor condição de anodização a avaliação celular foi realizada quanto a adesão, proliferação e viabilidade celular. Nas figuras 39 (a-b) e 40 (a-b) podem ser observadas as células fibroblásticas cultivadas para o grupo controle e para os nanotubos de Ti-30Ta (Figura 41 (a-b) e 42 (a-b) nas primeiras 24 horas, em menor e maior aumento. É possível identificar o aumento da adesão e proliferação celular na superfície nanotubular quando comparado com o grupo controle. Quanto ao alinhamento das células fibroblásticas, observa-se um alinhamento regular na superfície tubular e uma distribuição de forma aleatória na superfície do grupo controle demonstrando uma maior organização da célula fibroblásticas na superfície tubular.

Na figura 41 (a-b) e 42 (a-b) podem ser observadas as células fibroblásticas cultivadas para o grupo controle e para os nanotubos de Ti-30Ta após 72 horas de cultura, em menor e maior aumento. O aumento da adesão e proliferação na superfície tubular é expressivo neste momento quando comparado ao grupo controle. O alinhamento celular foi significativo no grupo controle e nos nanotubos, porém foi maior na superfície nanotubular, o que reflete uma maior organização da célula fibroblásticas. Células esféricas puderam ser observadas na superfície dos nanotubos após 72 horas de cultura, logo a ativação dos fibroblastos foi mais elevada na superfície nanotubular do que no grupo controle, promovendo alongamento e proliferação celular o que resulta numa maior interação célula-célula.

Esta resposta celular indica maior interação de fibroblastos com a superfície nanotubular, para 24 horas e 72 horas e, provavelmente, melhores interação tecido/implante. O aumento das atividades metabólicas nas células esta relacionado com o numero de células vivas. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Demetrecus, Pirvu, Mitran (2010) que investigou a adesão e proliferação de células fibroblásticas na superfície de nanotubos de TiO_2 e titânio puro como controle e também de Brammer et al. (2009) que também estudou nanotubos de TiO_2 e titânio puro porém cultivando células osteoblásticas. Para esses autores os melhores resultados também foram obtidos nas superfícies contendo nanotubos.

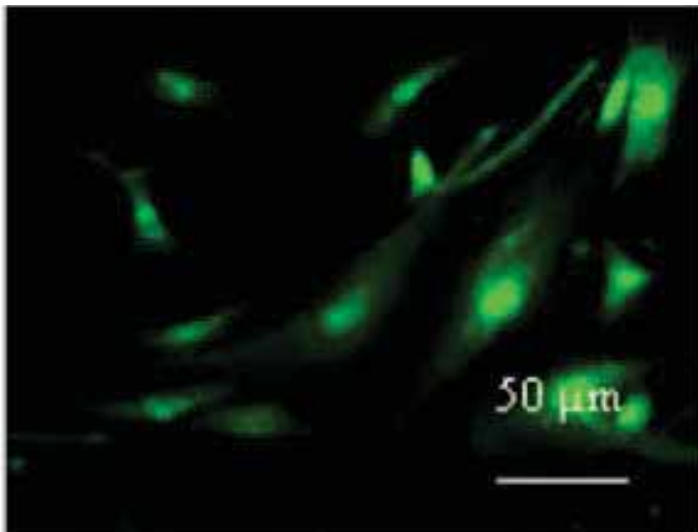


(a)

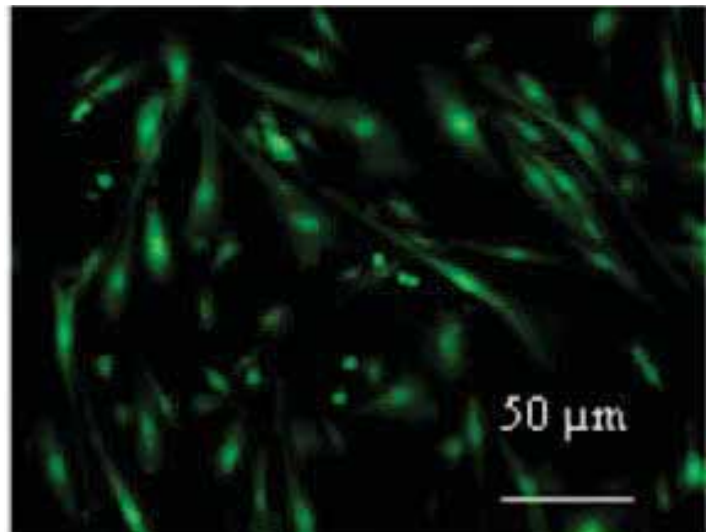


(b)

Figura 39 – (a-b) imagens após 24 horas de cultura de células fibroblásticas com calcein-AM, no grupo controle em microscópio de fluorescência

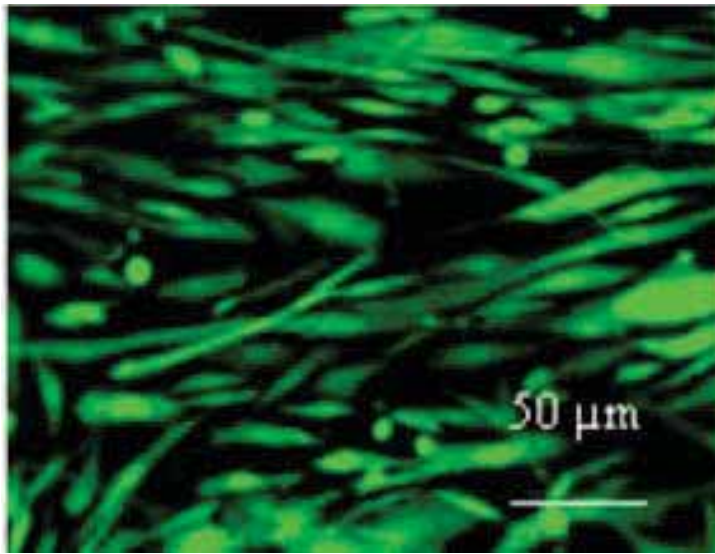


(a)

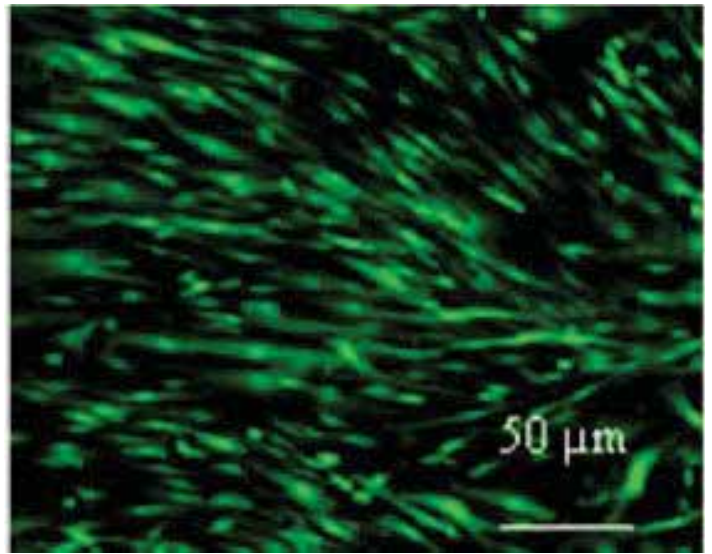


(b)

Figura 40 – (a-b) imagens após 24 horas de cultura de células fibroblásticas com calcein-AM, nos nanotubos de Ti-30Ta em microscópio de fluorescência

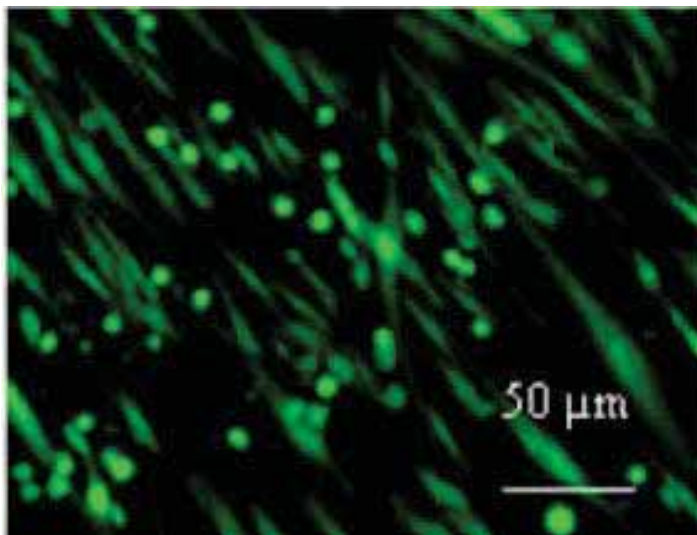


(a)

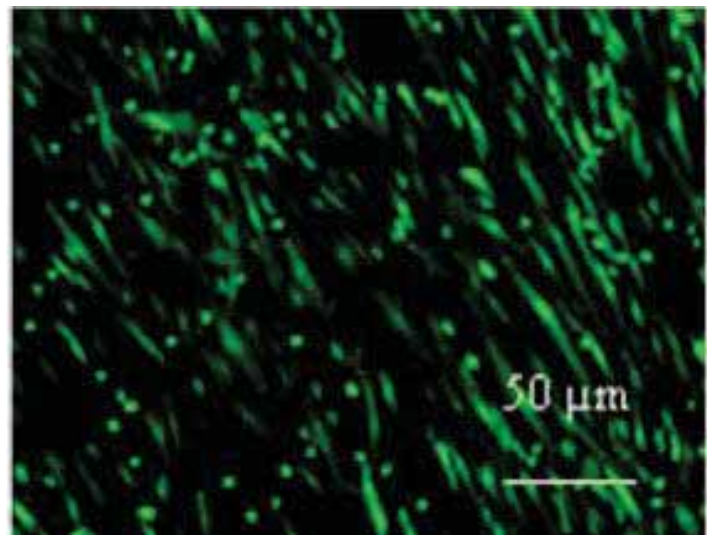


(b)

Figura 41 – (a-b) imagens após 72 horas de cultura de células fibroblásticas com calcein-AM, no grupo controle em microscópio de fluorescência



(a)



(b)

Figura 42 – (a-b) imagens após 72 horas de cultura de células fibroblásticas com calcein-AM, nos nanotubos de Ti-30Ta em microscópio de fluorescência

As imagens obtidas em microscópio de fluorescência foram analisadas com o auxílio do software Image J, para identificar a cobertura celular fibroblástica após 24 horas e 72 horas de cultura celular.

Na Tabela 3 são apresentados os valores médios percentuais obtidos para as análises da cobertura de células fibroblásticas após 24 horas e 72 horas. O grupo controle apresentou valores de porcentagem de cobertura de 8,2 % e 24,5% após 24 horas e 72 horas, respectivamente. Por outro lado, a superfície nanotubular apresentou após 24 horas um valor de porcentagem de cobertura de 10,40 % e após 72 horas um valor de 41% de cobertura celular. Os resultados mostraram um aumento na porcentagem de cobertura celular fibroblástica na superfície de nanotubos de Ti-30Ta quando comparada com o grupo controle tanto para o grupo analisado em 24 horas como para 72 horas (Figura 43).

Tabela 3- Porcentagem de cobertura de células fibroblásticas após 24 horas e 72 horas

Grupos	24 horas (Média ± Desvio Padrão)	72 horas (Média ± Desvio Padrão)
Controle	8,2 ± 0,95	24,5 ± 2,5
Nanotubos	10,40 ± 3,16	41 ± 1,70

Para confirmar a adesão celular e estimar a densidade de células viáveis o teste MTT foi realizado. Na Figura 44 pode ser observada os resultados do teste de MTT após 24 horas e 72 horas de cultura no grupo controle e na superfície tubular. Os resultados mostram que ambas as superfícies avaliadas apresentaram um aumento significativo na viabilidade celular após 24 horas e 72 horas de cultura. Porém a viabilidade celular foi significativamente maior na superfície tubular após 72 horas de cultura. Os resultados claramente indicam uma relação positiva entre a integração de fibroblastos e a superfície tubular.

Smith et al. (2010, 2011) utilizou o teste de MTT para avaliar a citotoxicidade de titânio CP e nanotubos de TiO₂ encontrando resultados que demonstram que a viabilidade celular apresenta significativo aumento na superfície de nanotubos de TiO₂ quando comparados com o grupo controle. Estes resultados estão de acordo com os resultados

encontrados neste trabalho. Sugere-se, portanto que a estrutura tubular apresenta um maior número de células com conseqüente maior atividade mitocondrial. Ruckh et al. (2009) determinou através do MTT a viabilidade celular em nanotubos de TiO_2 e titânio CP encontrando resultados similares ao deste trabalho.

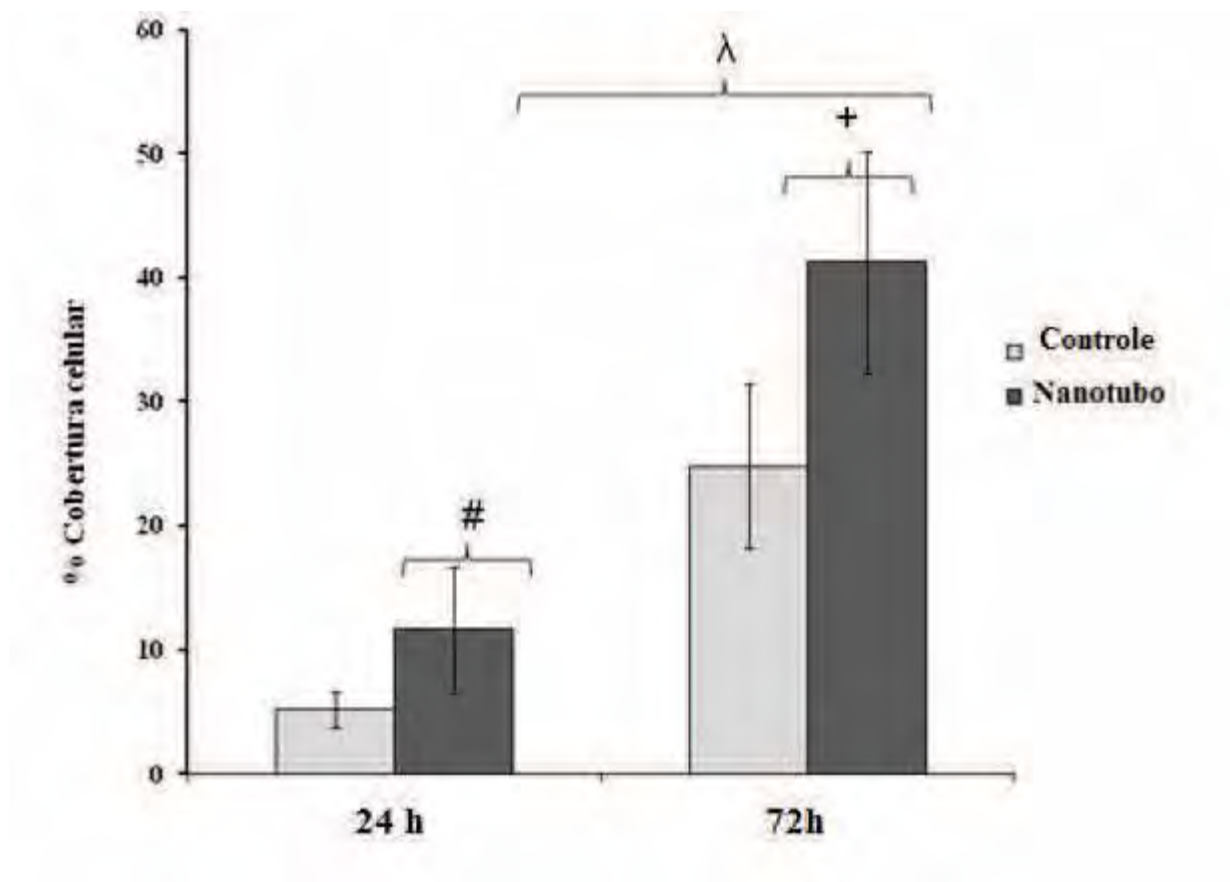


Figura 43 - Gráfico da % de cobertura celular após 24 e 72 horas de cultivo de células fibroblásticas no grupo controle e na liga Ti-30Ta com nanotubos

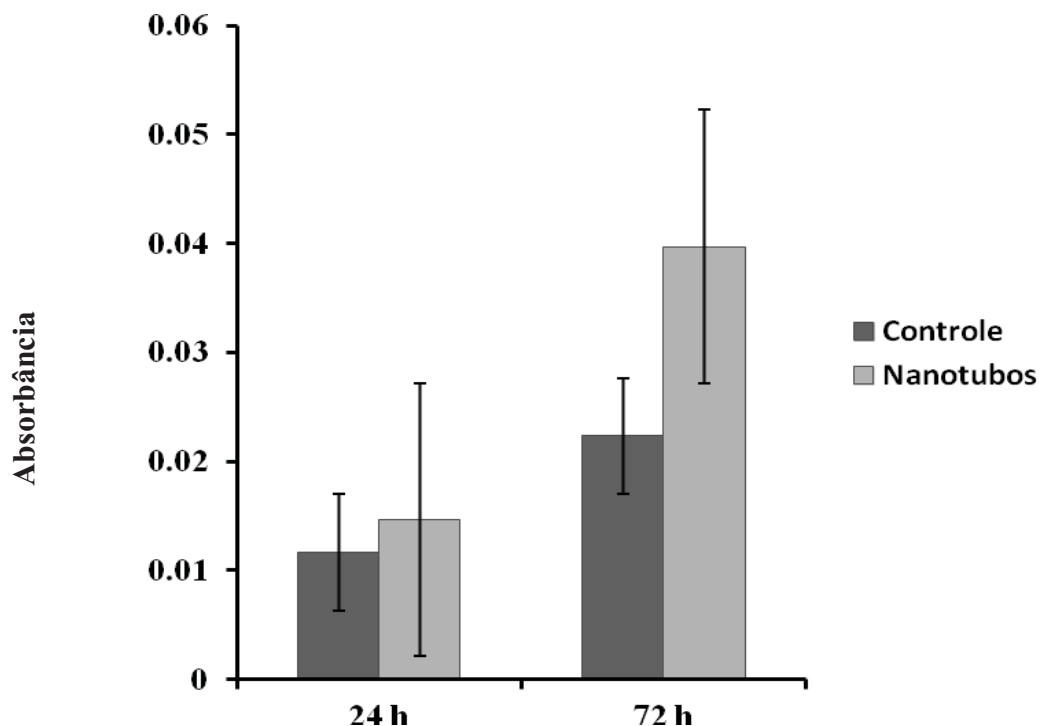


Figura 44- Teste MTT após 24 e 72 horas de cultura em células fibroblásticas no grupo controle e na liga Ti-30Ta com nanotubos

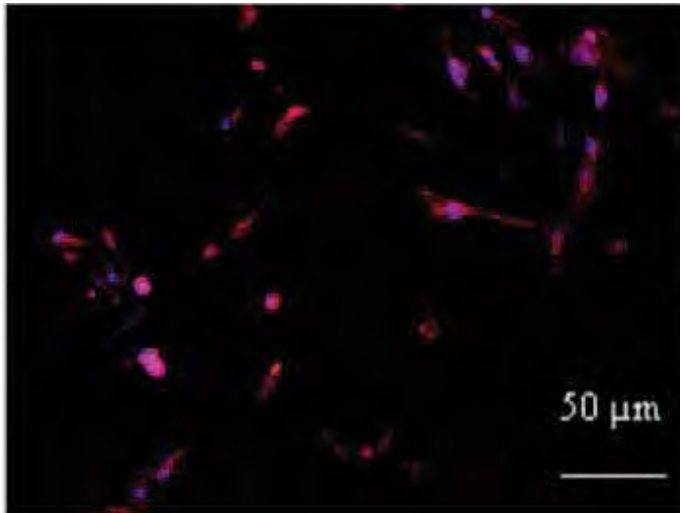
4.2.2 Organização citoesquelética

O citoesqueleto celular é composto de microfilamentos, microtubos e filamentos intermediários. Quando estes componentes são ativados eles desempenham papel importante na comunicação célula-célula e célula-matriz extracelular, assim como em eventos como, divisão, movimento e secreção de proteínas. Então a interação celular com nanotubos de Ti-30Ta pode resultar numa reorganização do citoesqueleto.

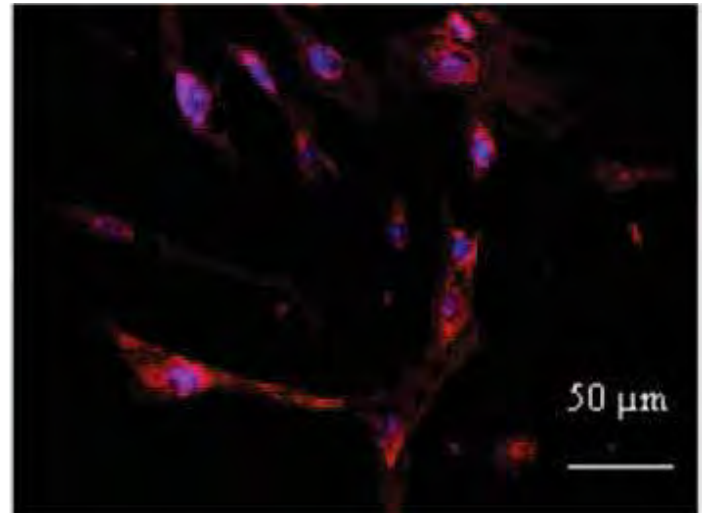
Na figura 45 (a-b) e 46 (a-b) é possível observar as imagens obtidas em microscópio de fluorescência do grupo controle e para a superfície nanotubular após 24 horas e nas Figuras 47 (a-b) e 48 (a-b) após 72 horas de cultura. Verificou-se o alongamento do citoesqueleto em ambos os substratos, porém maior comprimento foi verificado na superfície nanotubular tanto após 24 horas como após 72 horas. As imagens indicam maior proliferação, comunicação e integração celular na superfície tubular.

Estes resultados estão de acordo com estudo realizado por Smith et al. (2011) onde a superfície coberta com nanotubos de TiO_2 apresentou células fibroblásticas com

alongamento do citoesqueleto e também com Das, Bose, Bandyopadhyay (2008) e Brammer et al. (2009) que investigaram células osteoblásticas em nanotubos de TiO_2 com diferentes diâmetros encontrando alongamento do citoesqueleto em todas as condições investigadas.

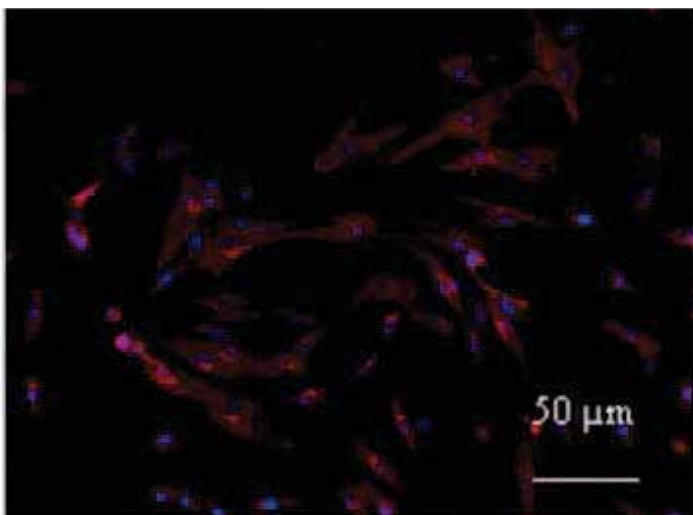


(a)

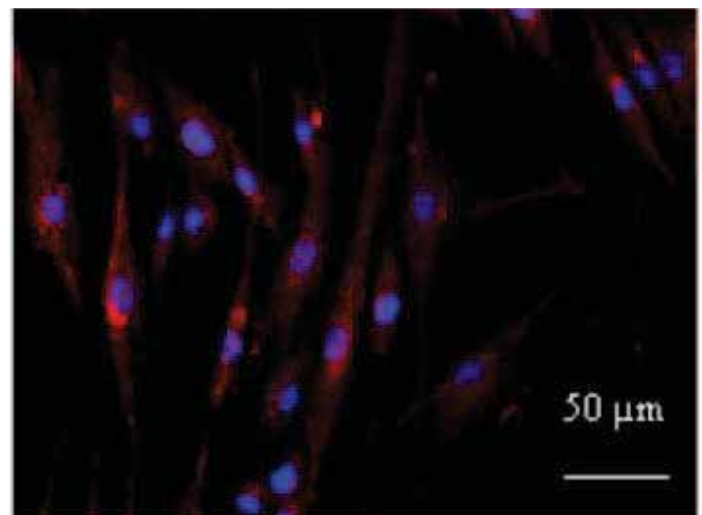


(b)

Figura 45 – (a-b) imagens após 24 horas de cultura de células fibroblásticas com F-actin e DAPI, no grupo controle em microscópio de fluorescência

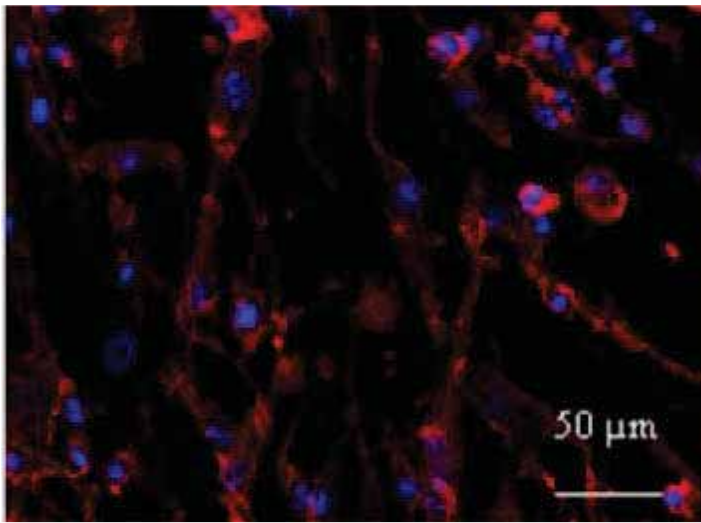


(a)

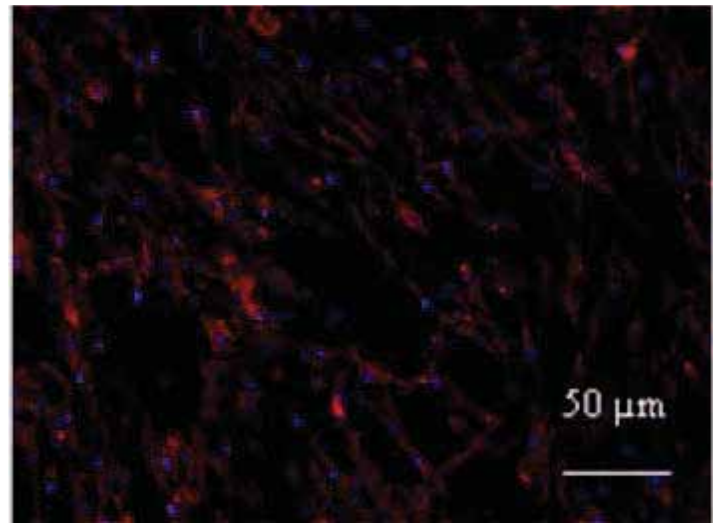


(b)

Figura 46 – (a-b) imagens após 24 horas de cultura de células fibroblásticas com F-actin, na liga Ti-30Ta com nanotubos em microscópio de fluorescência

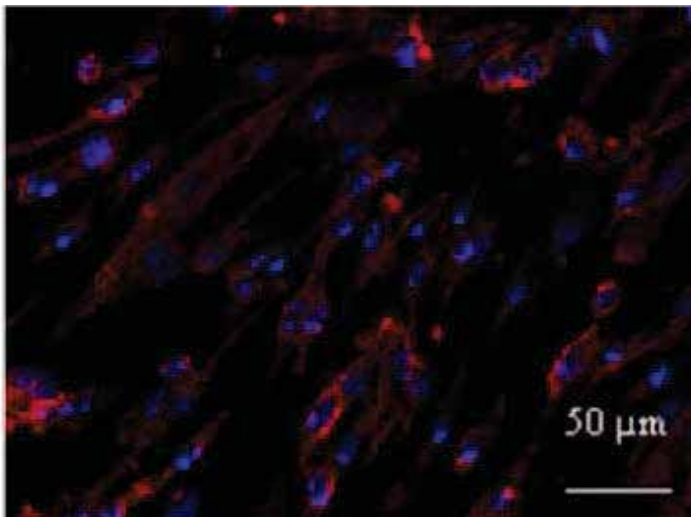


(a)

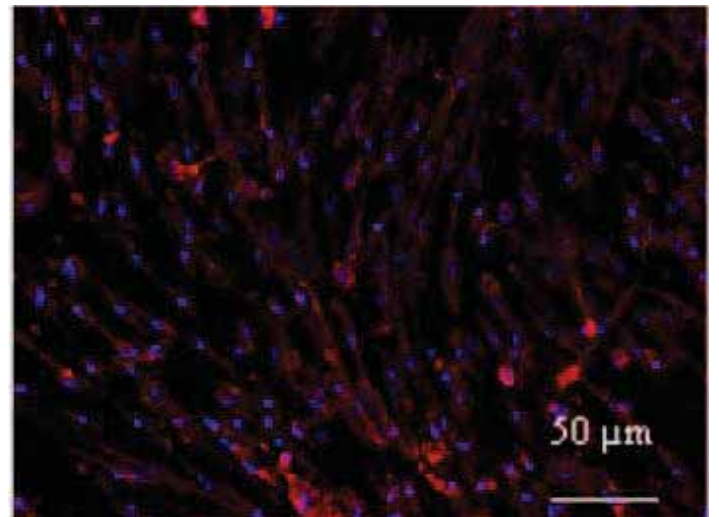


(b)

Figura 47 – (a-b) imagens após 72 horas de cultura de células fibroblásticas com F-actin, no grupo controle em microscópio de fluorescência



(a)



(b)

Figura 48 – (a-b) imagens após 72 horas de cultura de células fibroblásticas com F-actin, na liga Ti-30Ta com nanotubos em microscópio de fluorescência

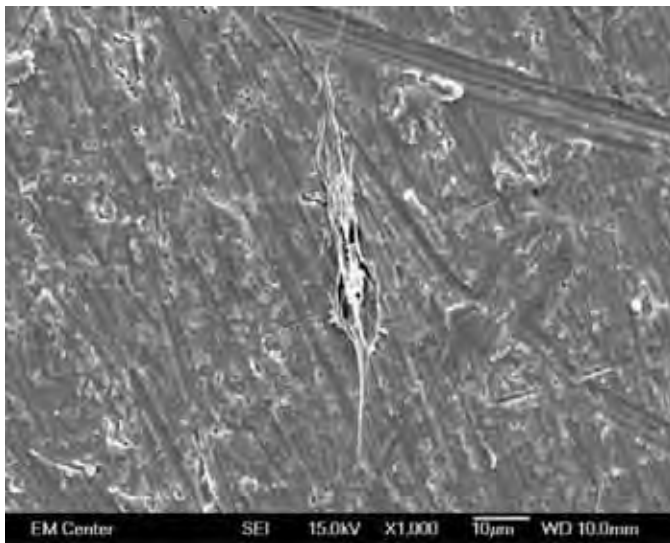
4.2.3 Morfologia celular

O aumento da agregação e ativação celular leva a um aumento da produção da matriz celular, medido a partir da visualização da morfologia celular em MEV-FEG. A matriz extracelular é o agrupamento de elementos intercelulares dos organismos multicelulares. Os tecidos, os órgãos e sistemas são resultados de associações de diferentes tipos de células e matrizes extracelulares. Entre suas funções podemos citar preenchimento de espaços não ocupados pelas células, resistência aos tecidos, veículo de migração e ancoragem celular, meio por onde chegam os nutrientes e sejam eliminados os dejetos celulares e meio para transporte de sinais intercelulares.

Nas imagens de MEV-FEG podem ser observadas a morfologia das células fibroblásticas após 24 horas (Figura 49 (a-c) e 50 (a-d)) e 72 h (Figura 51 (a-c) e 52 (a-e)) de cultura para o grupo controle e para a superfície nanotubular, em menor e maior aumento. Os resultados indicam um aumento considerável na interação de fibroblastos com a superfície tubular após 24 horas de cultura. Após 72 horas de cultura, o grupo controle mostra uma mistura de células claras ativas e inativas e nas imagens da superfície nanotubular é possível identificar produção de matriz extracelular, ausente no grupo controle. Estes resultados indicam a presença dos componentes extracelulares com a formação de matriz extra celular em diferentes quantidades cobrindo toda a superfície tubular.

Estes resultados estão de acordo com Smith et al. (2011), Demetrecus, Pirvu, Mitran (2010) e Cheung et al. (2007) que investigaram a cultura de células fibroblásticas em nanotubos de TiO_2 quanto a morfologia celular encontrando resultados similares ao deste trabalho e concluindo que a superfície tubular pode ser mais favorável a produção de matriz extra celular.

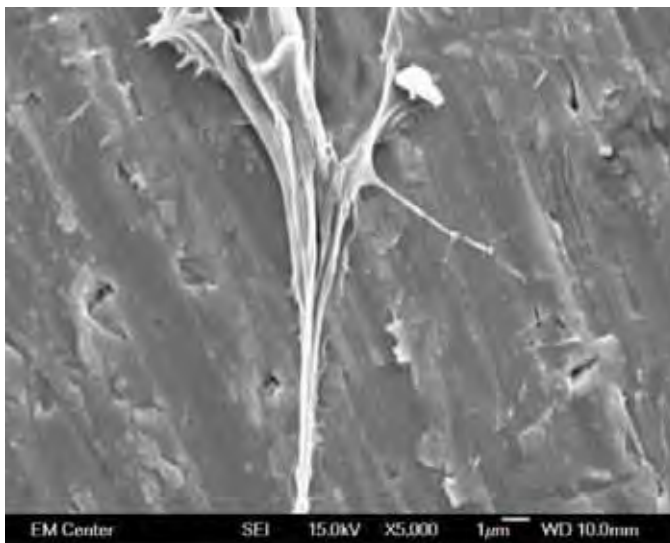
Oh, Shim, Kim (2005), Ruckh et al. (2009), Vetrone et al. (2009) e Choe (2011) investigaram a produção de matriz extracelular em nanotubos de TiO_2 porém utilizaram células mesenquimais e osteoblásticas. Nestes experimentos os autores encontraram resultados que estão de acordo com este trabalho. A produção de matriz extracelular é significativamente aumentada na superfície tubular independentemente da célula investigada e do tamanho do nanotubo.



(a)

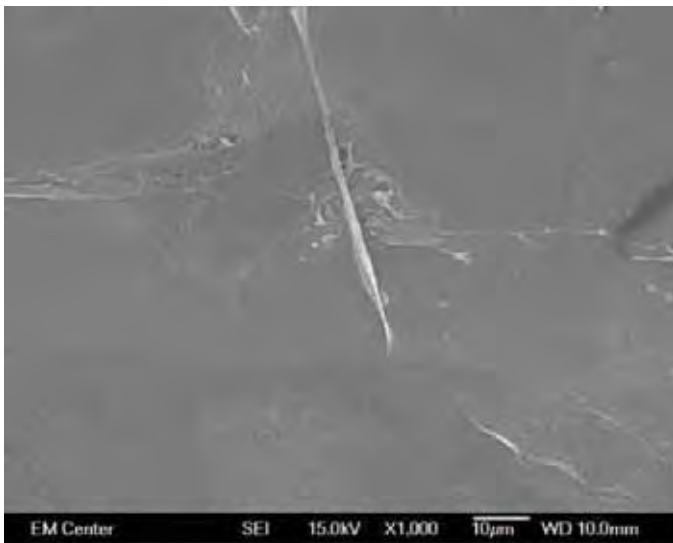


(b)



(c)

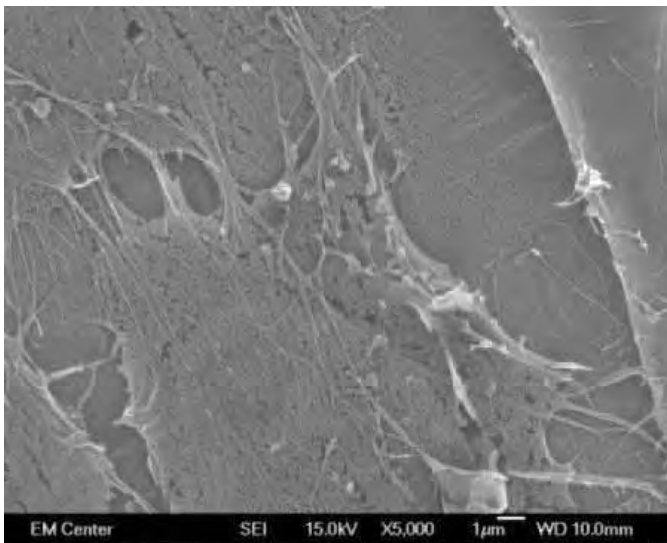
Figura 49- (a-c) imagens de células fibroblásticas após 24 horas de cultura no grupo controle



(a)



(b)

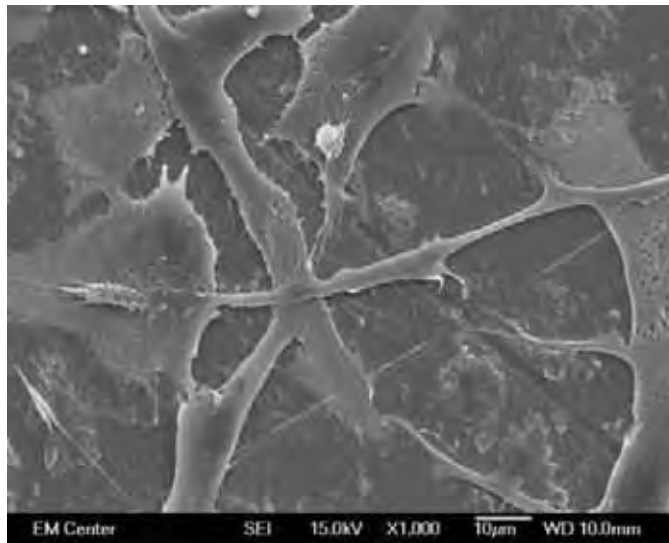


(c)

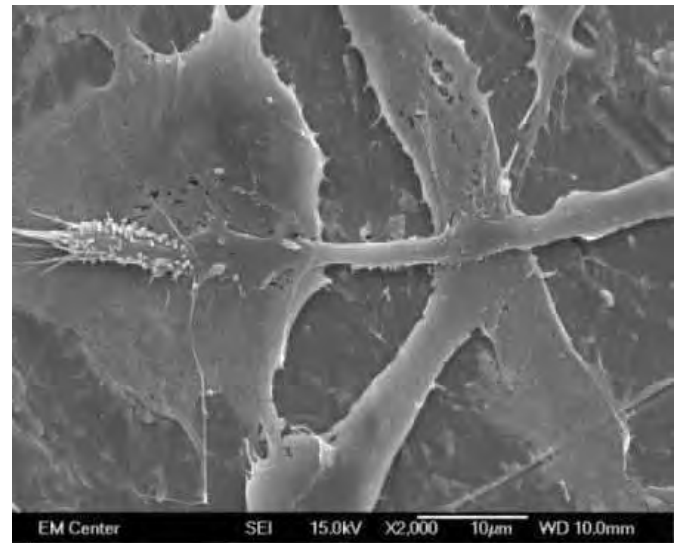


(d)

Figura 50- (a-d) imagens de células fibroblásticas após 24 horas de cultura na liga Ti-30Ta com nanotubos



(a)



(b)



(c)

Figura 51- (a-c) imagens de células fibroblásticas após 72 horas de cultura no grupo controle



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 52- (a-e) imagens de células fibroblásticas após 72 horas de cultura na liga Ti-30Ta com nanotubos

5 CONCLUSÃO

A partir da realização deste trabalho foi possível concluir que:

- Foi possível a obtenção de nanotubos na liga Ti-30Ta fabricados em eletrólito HF + H₂SO₄ + (1:9) 5% DMSO - tensão 35V por 40 min
- Os nanotubos apresentam 80-100 nm de diâmetro e 100 nm de comprimento
- A presença de nanotubos na superfície da liga Ti-30Ta aumentou a adesão e proliferação celular, viabilidade, alongamento e aumento da produção de matriz celular

Os resultados indicam melhora nas propriedades do substrato com nanotubos de Ti-30Ta, juntamente com expressivo aumento da funcionalidade celular na superfície de nanotubos de Ti-30Ta. Assim, a formação de nanotubos na liga Ti-30Ta tem potencial para fornecer uma interface de sucesso para implantes dentários.

6 SUGESTÃO PARA TRABALHO FUTURO

Baseando-se nos resultados apresentados, sugerimos para futuros trabalhos:

-Investigação do óxido formado na superfície tubular através da técnica difração de raios X e XPS (espectroscopia de foto- elétrons de raios-X).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAM, N. K.; FENG, X. J.; GRIMES, C. A. Self-Assembled Fabrication of Vertically Oriented Ta₂O₅ Nanotube Arrays, and Membranes Thereof, by One-Step Tantalum Anodization. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 20, p. 6477-6481, 2008. ISSN 0897-4756. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cm801472y> >.
- ALTANKOV, G.; GRINNELL, F.; GROTH, T. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 30, n. 3, p. 385-391, 1996. ISSN 1097-4636. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199603\)30:3<385::AID-JBM13>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199603)30:3<385::AID-JBM13>3.0.CO;2-J) >.
- BACAKOVA, L. et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 739-767, 2011. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000802> >.
- BALAZIC, M. et al. Review: titanium and titanium alloy applications in medicine. **International Journal of Nano and Biomaterials**, v. 1, n. 1, p. 3-34, 2007. Disponível em: < <http://inderscience.metapress.com/content/R131038011086662> >.
- BALLA, V. K. et al. Direct laser processing of a tantalum coating on titanium for bone replacement structures. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 6, p. 2329-2334, 2010. ISSN 1742-7061. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706109005170> >.
- BANNON, B. P. M., E E Ed. **Titanium Alloys in Surgical Implants**. Titanium Alloys for Biomaterial Application: an Overview. Phoenix, Ariz ; U.S.A, p.pp. 7-15, Titanium Alloys for Biomaterial Application: an Overviewed. 1983.
- BARRERE, F. et al. Nano-scale study of the nucleation and growth of calcium phosphate coating on titanium implants. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2901-2910, 2004. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWPB-4B1X4Y0-2/2/b7cc88f21a8642125b504d3c33a5f441> >.
- BARTON, J. E. et al. Structural control of anodized tantalum oxide nanotubes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 28, p. 4896-4898, 2009. ISSN 0959-9428. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B904964A> >.
- BAUER, S. et al. Improved attachment of mesenchymal stem cells on super-hydrophobic TiO₂ nanotubes. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1576-1582, 2008. ISSN 1742-7061. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706108001086> >.
- BERGER, S.; TSUCHIYA, H.; SCHMUKI, P. Transition from Nanopores to Nanotubes: Self-Ordered Anodic Oxide Structures on Titanium-Aluminides. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 10, p. 3245-3247, 2008/05/01 2008. ISSN 0897-4756. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cm8004024> >. Acesso em: 2012/02/07.
- BJURSTEN, L. M. et al. Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 92A, n. 3, p. 1218-1224, 2010. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.32463> >.
- BOYAN, B. D. et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. **European cells & materials**, v. 6, p. 22-7, 2003. Disponível em: < <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/14577052> >.
- BOZIC, K. et al. The Epidemiology of Revision Total Knee Arthroplasty in the United States. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 468, n. 1, p. 45-51, 2010. ISSN 0009-921X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11999-009-0945-0> >.
- BOZKUS, I.; GERMEC-CAKAN, D.; ARUN, T. Evaluation of Metal Concentrations in Hair and Nail After Orthognathic Surgery. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 22, n. 1, p. 68-72 10.1097/SCS.0b013e3181f6c456, 2011. ISSN 1049-2275. Disponível em: <

http://journals.lww.com/jcraniofacialsurgery/Fulltext/2011/01000/Evaluation_of_Metal_Concentrations_in_Hair_and.15.aspx >.

BRAMMER, K. S. et al. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 8, p. 3215-3223, 2009. ISSN 1742-7061. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706109002104> >.

BRAMMER, K. S. et al. Enhanced cellular mobility guided by TiO₂ nanotube surfaces. **Nano Letters**, v. 8, n. 3, p. 786-793, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-43149103938&partnerID=40&md5=884e91c183de12d78e73f0ab37508246> >.

BRANEMARK, P. I. Osseointegration and its experimental background. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 50, n. 3, p. 399-410, 1983. Disponível em: < <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/6352924> >.

CHEUNG, S. et al. Fibroblastic interactions with high-porosity Ti-6Al-4V metal foam. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 82B, n. 2, p. 440-449, 2007. ISSN 1552-4981. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.30749> >.

CHU, P. K. et al. Plasma-surface modification of biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 36, n. 5-6, p. 143-206, 2002. ISSN 0927-796X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927796X02000049> >.

DALBY, M. J. et al. Genomic expression of mesenchymal stem cells to altered nanoscale topographies. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, n. 26, p. 1055-1065, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-47649092532&partnerID=40&md5=e460c985b59d107b67d42715a21bfba4> >.

DAS, K.; BOSE, S.; BANDYOPADHYAY, A. TiO₂ nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 90A, n. 1, p. 225-237, 2009. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.32088> >.

DEMETRESCU, I.; PIRVU, C.; MITRAN, V. Effect of nano-topographical features of Ti/TiO₂ electrode surface on cell response and electrochemical stability in artificial saliva. **Bioelectrochemistry**, v. 79, n. 1, p. 122-129, 2010. ISSN 1567-5394. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539410000216> >.

DOBROMYSLOV, A. et al. Phase and structural transformations in Ti-Ta alloys. **The Physics of Metals and Metallography**, v. 107, n. 5, p. 502-510, 2009. ISSN 0031-918X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1134/S0031918X09050111> >.

EISENBARTH, E. et al. Biocompatibility of [beta]-stabilizing elements of titanium alloys. **Biomaterials**, v. 25, n. 26, p. 5705-5713, 2004. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWPB-4BWYCV9-4/2/b6dd5dcca5df50c2ee9eea6e676df0ec> >.

EL-SAYED, H. et al. Formation of Highly Ordered Arrays of Dimples on Tantalum at the Nanoscale. **Nano Letters**, v. 6, n. 12, p. 2995-2999, 2006. ISSN 1530-6984. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/nl062347r> >.

EL-SAYED, H. A.; BIRSS, V. I. Controlled Interconversion of Nanoarray of Ta Dimples and High Aspect Ratio Ta Oxide Nanotubes. **Nano Letters**, v. 9, n. 4, p. 1350-1355, 2009. ISSN 1530-6984. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/nl803010v> >.

EL-SAYED, H. A.; BIRSS, V. I. Controlled growth and monitoring of tantalum oxide nanostructures. **Nanoscale**, v. 2, n. 5, p. 793-798, 2010. ISSN 2040-3364. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C0NR00011F> >.

ELLINGSEN, J. E.; THOMSEN, P.; LYGSTADAAS, S. P. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. **Periodontology** 2000, v. 41, n. 1, p. 136-156, 2006. ISSN 1600-0757. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00175.x> >.

FENG, X. et al. Ta₃N₅ Nanotube Arrays for Visible Light Water Photoelectrolysis. **Nano Letters**, v. 10, n. 3, p. 948-952, 2010. ISSN 1530-6984. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/nl903886e> >.

FUKUMOTO, S. et al. Surface modification of titanium by nitrogen ion implantation. **Materials Science and Engineering A**, v. 263, n. 2, p. 205-209, 1999. ISSN 0921-5093. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921509398011666> >.

GALANTE, J. O. et al. The biologic effects of implant materials. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 760-775, 1991. ISSN 1554-527X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jor.1100090516> >.

GEETHA, M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397-425, 2009. ISSN 0079-6425. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TX1-4V47C93-1/2/8a7ac634c79162a0bdcc5b67533bdc95> >.

GILL, P. et al. Effect of Manufacturing Process on the Biocompatibility and Mechanical Properties of Ti-30Ta Alloy. **Journal of Materials Engineering and Performance**, v. 20, n. 4, p. 819-823, 2011. ISSN 1059-9495. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11665-011-9874-7> >.

GROTH, T.; ALTANKOV, G. Studies on cell-biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability. **Biomaterials**, v. 17, n. 12, p. 1227-1234, 1996. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014296129684943X> >.

HABIBOVIC, P. et al. Osteoinduction by biomaterials—Physicochemical and structural influences. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 77A, n. 4, p. 747-762, 2006. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30712> >.

HAN-CHEOL, C. Nanotubular surface and morphology of Ti-binary and Ti-ternary alloys for biocompatibility. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 15, p. 4652-4657, 2011. ISSN 0040-6090. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040609011000137> >.

<http://implantesdentales-co.blogspot.com>.

JEONG, Y.-H.; CHOE, H.-C.; BRANTLEY, W. A. Electrochemical and surface behavior of hydroxyapatite/Ti film on nanotubular Ti-35Nb-xZr alloys. **Applied Surface Science**, n. 0, ISSN 0169-4332. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433211004508> >.

JHA, H.; HAHN, R.; SCHMUKI, P. Ultrafast oxide nanotube formation on TiNb, TiZr and TiTa alloys by rapid breakdown anodization. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 28, p. 8883-8887, 2010. ISSN 0013-4686. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG0-50RP238-8/2/17b360bea19f73eb14b682a767606263> >.

JIANTING, G.; RANUCCI, D.; GHERARDI, F. Precipitation of β phase in the γ' particles of nickel-base superalloy. **Metallurgical and Materials Transactions A**, v. 15, n. 7, p. 1331-1334, 1984. ISSN 1073-5623. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02648561> >.

JOHN C, W. Predicting clinical biological responses to dental materials. **Dental Materials**, v. 28, n. 1, p. 23-40, 2012. ISSN 0109-5641. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564111008293> >.

KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2161-2175, 2003. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-482G97R-4/2/07f28df4e9c0f0d99731c8bf9f1b613a> >.

KURELLA, A.; DAHOTRE, N. B. Review paper: Surface Modification for Bioimplants: The Role of Laser Surface Engineering. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 20, n. 1, p. 5-50, July 1, 2005 2005. Disponível em: < <http://jba.sagepub.com/content/20/1/5.abstract> >.

LANG, N. P. et al. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, n. 4, p. 349-356, 2011. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02172.x> >.

- LEI, M. K. et al. Wear and corrosion properties of plasma-based low-energy nitrogen ion implanted titanium. **Surface and Coatings Technology**, v. 205, n. 19, p. 4602-4607, 2011. ISSN 0257-8972. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0257897211003410> >.
- LIU, X.; CHU, P. K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 47, n. 3-4, p. 49-121, 2004. ISSN 0927-796X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927796X0400124X> >.
- LIU, X. et al. Bioactive calcium silicate ceramics and coatings. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 8, p. 526-529, 2008. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333220800231X> >.
- MACAK, J. M.; SIRODNA, K.; SCHMUKI, P. Self-organized porous titanium oxide prepared in Na₂SO₄/NaF electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 18, p. 3679-3684, 2005. ISSN 0013-4686. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468605000642> >.
- MACAK, J. M. et al. TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 11, n. 1-2, p. 3-18, 2007. ISSN 1359-0286. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359028607000496> >.
- MARECI, D. et al. Comparative corrosion study of Ti-Ta alloys for dental applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 9, p. 3625-3639, 2009. ISSN 1742-7061. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7GHW-4WGDR48-3/2/eaf8f274ca3b2e67aad1dc5578fc24de> >.
- MENDONÇA, G. et al. Advancing dental implant surface technology - From micron- to nanotopography. **Biomaterials**, v. 29, n. 28, p. 3822-3835, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-48049104101&partnerID=40&md5=ea1ec86f0188ed6912263b72dcdcbf73> >.
- MIYAZAKI, T. et al. Bioactive tantalum metal prepared by NaOH treatment. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 50, n. 1, p. 35-42, 2000. ISSN 1097-4636. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200004\)50:1<35::AID-JBM6>3.0.CO;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200004)50:1<35::AID-JBM6>3.0.CO;2-8) >.
- MIYAZAKI, T. et al. Effect of thermal treatment on apatite-forming ability of NaOH-treated tantalum metal. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, n. 8, p. 683-687, 2001. ISSN 0957-4530. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1011260224120> >.
- MIYAZAKI, T. et al. Enhancement of bonding strength by graded structure at interface between apatite layer and bioactive tantalum metal. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 7, p. 651-655, 2002. ISSN 0957-4530. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1015729507800> >.
- MJÖBERG, B. et al. Aluminum, Alzheimer's disease and bone fragility. **Acta Orthopaedica**, v. 68, n. 6, p. 511-514, 1997. Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/17453679708999016> >.
- NIINOMI, M. Recent metallic materials for biomedical applications. **Metallurgical and Materials Transactions A**, v. 33, n. 3, p. 477-486, 2002. ISSN 1073-5623. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11661-002-0109-2> >.
- NIINOMI, M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 1, n. 1, p. 30-42, 2008. ISSN 1751-6161. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B8G3J-4PHJH51-1/2/6db3198c9ce65f0573df79a3ccaa311b> >.
- OH, K.-T.; SHIM, H.-M.; KIM, K.-N. Properties of titanium-silver alloys for dental application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 74B, n. 1, p. 649-658, 2005. ISSN 1552-4981. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.30259> >.
- OH, S. et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2130-2135, 2009. Disponível em: <

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-60549098069&partnerID=40&md5=643c92723d98731d0ce7734916f79e5d> >.

OH, S. et al. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 78A, n. 1, p. 97-103, 2006. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30722> >.

OH, S.; JIN, S. Titanium oxide nanotubes with controlled morphology for enhanced bone growth. **Materials Science and Engineering: C**, v. 26, n. 8, p. 1301-1306, 2006. ISSN 0928-4931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TXG-4H68T0V-2/2/fdf888aa93dcb5367f6bb7a6ea102dce> >.

PARK, J. et al. TiO₂ nanotube surfaces: 15 nm - an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation. **Small**, v. 5, n. 6, p. 666-671, 2009. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-63149176535&partnerID=40&md5=f8e721fdd1f4f1dcf9d8cb03d5744dde> >.

POPAT, K. C. et al. Osteogenic differentiation of marrow stromal cells cultured on nanoporous alumina surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 80A, n. 4, p. 955-964, 2007. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31028> >.

POPAT, K. C. et al. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. **Biomaterials**, v. 28, n. 21, p. 3188-3197, 2007. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-4N9P4PK-2/2/f2d5005172fb53c3755e28ef45e66140> >.

PORTER, J. R.; HENSON, A.; POPAT, K. C. Biodegradable poly([var epsilon]-caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 30, n. 5, p. 780-788, 2009. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-4TXDXJS-1/2/fa855f23e9c95ad4b18b4497e9c36119> >.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual review of biomedical engineering**, v. 6, p. 41-75, 2004. Disponível em: < <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/15255762> >.

REGONINI, D. et al. Effect of heat treatment on the properties and structure of TiO₂ nanotubes: phase composition and chemical composition. **Surface and Interface Analysis**, v. 42, n. 3, p. 139-144, 2010. ISSN 1096-9918. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/sia.3183> >.

RIEDEL, N.; WILLIAMS, J.; POPAT, K. Ion beam etching titanium for enhanced osteoblast response. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 18, p. 6087-6095, 2011. ISSN 0022-2461. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10853-011-5571-z> >.

ROSHASNORLYZA, H. et al. **Surface Engineering of Titania for Excellent Fibroblast 3T3 Cell-Metal Interaction**: Universiti Sains Malaysia Press 2009.

ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 13, p. 2904-2939, 2011. ISSN 1521-3773. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201001374> >.

RUCKH, T. et al. Nanostructured tantalum as a template for enhanced osseointegration. **Nanotechnology**, v. 20, n. 4, p. 045102, 2009. Disponível em: < <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/19417310> >.

SHIMOJO, N. et al. Cytotoxicity analysis of a novel titanium alloy in vitro: Adhesion, spreading, and proliferation of human gingival fibroblasts. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 17, n. 2, p. 127-135, 2007. Disponível em: < <http://iospress.metapress.com/content/6HRN50AAA8X13RG2> >.

SIEBER, I.; KANNAN, B.; SCHMUKI, P. Self-Assembled Porous Tantalum Oxide Prepared in H₂SO₄/HF Electrolytes. **Electrochemical and Solid-State Letters**, v. 8, n. 3, p. J10-J12, 2005. Disponível em: < <http://link.aip.org/link/?ESL/8/J10/1> >.

SMITH, B. S. et al. Hemocompatibility of titania nanotube arrays. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95A, n. 2, p. 350-360, 2010. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.32853> >.

SMITH, B. S. et al. Dermal fibroblast and epidermal keratinocyte functionality on titania nanotube arrays. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2686-2696, 2011. ISSN 1742-7061. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706111001267> >.

TAKAO, H. Recent development of new alloys for biomedical use. **Trans Tech,Stafa-Zurich, SUISSE Materials science forum** v. 512, p. 243-248, 2006.

TEM CATE, A.R. **Oral histology: development, structure and function-The fibroblast and its products**. Toronto- Canada: A. R. Tem Cate (Ed). 1989. 90-105 pp.

TIM, M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034> >.

TSUCHIYA, H. et al. Anodic oxide nanotube layers on Ti-Ta alloys: Substrate composition, microstructure and self-organization on two-size scales. **Corrosion Science**, v. 51, n. 7, p. 1528-1533, 2009. ISSN 0010-938X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010938X08004976> >.

VARIOLA, F. et al. Improving Biocompatibility of Implantable Metals by Nanoscale Modification of Surfaces: An Overview of Strategies, Fabrication Methods, and Challenges. **Small**, v. 5, n. 9, p. 996-1006, 2009. ISSN 1613-6829. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/sml.200801186> >.

VETTRONE, F. et al. Nanoscale Oxidative Patterning of Metallic Surfaces to Modulate Cell Activity and Fate. **Nano Letters**, v. 9, n. 2, p. 659-665, 2009/02/11 2009. ISSN 1530-6984. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/nl803051f> >. Acesso em: 2012/01/03.

WANG, K. The use of titanium for medical applications in the USA. **Materials Science and Engineering: A**, v. 213, n. 1-2, p. 134-137, 1996. ISSN 0921-5093. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TXD-3VS92GC-R/2/4d14d458d6b1beafb1888de769ddc68b> >.

WANG, N. et al. Effects of TiO₂ nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 6900-6911, 2011. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211006880> >.

WEI, D. et al. Structure of calcium titanate/titania bioceramic composite coatings on titanium alloy and apatite deposition on their surfaces in a simulated body fluid. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 21, p. 8715-8722, 2007. ISSN 0257-8972. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TVV-4NP97V4-6/2/87f2b403f1ad65559e92f697f7758e0e> >.

WEI, W.; MACAK, J. M.; SCHMUKI, P. High aspect ratio ordered nanoporous Ta₂O₅ films by anodization of Ta. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 3, p. 428-432, 2008. ISSN 1388-2481. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248108000088> >.

WU, C. et al. Plasma-sprayed CaTiSiO₅ ceramic coating on Ti-6Al-4V with excellent bonding strength, stability and cellular bioactivity. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 6, n. 31, p. 159-68, 2009. Disponível em: < <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/18664431> >.

YAO, Q. et al. Influence of Nb and Mo contents on phase stability and elastic property of [beta]-type Ti-X alloys. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 17, n. 6, p. 1417-1421, 2007. ISSN 1003-6326. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1003632607602878> >.

ZAFFE, D.; BERTOLDI, C.; CONSOLO, U. Accumulation of aluminium in lamellar bone after implantation of titanium plates, Ti-6Al-4V screws, hydroxyapatite granules. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3837-3844, 2004. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203009359> >.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, v. 4, n. 1, p. 66-80, 2009. ISSN 1748-0132. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748013208000182> >.

ZHOU, Y.-L.; NIINOMI, M. Microstructures and mechanical properties of Ti-50 mass% Ta alloy for biomedical applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 466, n. 1-2, p. 535-542, 2008. ISSN 0925-8388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWY-4R715WK-7/2/b018697883777d4a2ca39d71d380cd32> >.

ZHOU, Y.-L.; NIINOMI, M. Ti-25Ta alloy with the best mechanical compatibility in Ti-Ta alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 3, p. 1061-1065, 2009. ISSN 0928-4931. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TXG-4TFDCFY-3/2/38b86cf6340b91ee3e2c4f2fb28bf267> >.

ZHOU, Y. L.; NIINOMI, M.; AKAHORI, T. Decomposition of martensite [alpha]" during aging treatments and resulting mechanical properties of Ti-Ta alloys. **Materials Science and Engineering A**, v. 384, n. 1-2, p. 92-101, 2004a. ISSN 0921-5093. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TXD-4D1R47H-J/2/523c0ffb9f8dcf4987237e1822520470> >.

ZHOU, Y. L.; NIINOMI, M.; AKAHORI, T. Effects of Ta content on Young's modulus and tensile properties of binary Ti-Ta alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering A**, v. 371, n. 1-2, p. 283-290, 2004b. ISSN 0921-5093. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TXD-4C0V7SX-P/2/c044b0071040ec8ed9b3fba6fabef848> >.

ZHOU, Y. L. et al. Corrosion resistance and biocompatibility of Ti-Ta alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering A**, v. 398, n. 1-2, p. 28-36, 2005. ISSN 0921-5093. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TXD-4G7JP3P-2/2/a54f82a568e3a4d8af9bdaaada9ece5> >.

ZHU, L. et al. Synthesis and microstructure observation of titanium carbonitride nanostructured coatings using reactive plasma spraying in atmosphere. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 20, p. 8722-8727, 2011. ISSN 0169-4332. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433211007586> >.